

**Untersuchung der cytogenetischen Wirkung von
Cadmium-Sulfat auf Zellkulturen des
Chinesischen Hamsters**

Günter Röhr

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554614_0053

Aus dem Institut für Biologie
der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH München
Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. med. Otto Hug

Untersuchung der cytogenetischen Wirkung von Cadmium-Sulfat
auf Zellkulturen des Chinesischen Hamsters

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Günter Röhr
aus München

1976



Mit Genehmigung
des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. rer.nat, Manfred Bauchinger
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Otto Hug
Dekan:	Prof. Dr. med. Wolfgang Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	24. 2. 1976

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG.....	1
2.	MATERIAL UND METHODEN.....	4
2.1	Zellkulturen.....	4
2.2	Nährmedium und sonstige verwendete Lösungen.....	6
2.2.1	Medium und Kälberserum.....	6
2.2.2	Solution A und Trypsinlösung.....	6
2.2.3	Testsubstanz.....	7
2.3	Die Haltung der Stammkulturen.....	7
2.4	Versuchsansatz und Chromosomenpräparation.....	8
2.4.1	Colcemidapplikation und hypotone Behandlung.....	9
2.4.2	Fixierung, Färbung und Eindecken.....	10
2.4.3	Experimente.....	10
2.4.3.1	Analyse struktureller Chromosomenaberrationen.....	10
2.4.3.2	Analyse von Störungen des mitotischen Bewegungs- apparates.....	11
2.5	Methoden der statistischen Auswertung.....	11
3.	VERSUCHSERGEBNISSE.....	12
3.1	Cytotoxizität von CdSO_4	12
3.1.1	Bestimmung der Letalkonzentration nach Langzeit- exposition.....	12
3.1.2	Untersuchung zellkernmorphologischer Veränderungen nach hochkonzentrierter CdSO_4 -Behandlung und Er- holung.....	16
3.1.3	Untersuchung zellkernmorphologischer Veränderungen nach hochkonzentrierter einstündiger CdSO_4 -Behand- lung und anschließender Erholung.....	18
3.1.4	Untersuchung der mitotischen Aktivität 15 - 21 h nach 10^{-4} molarer zweistündiger CdSO_4 -Behandlung....	22
3.2	Wirkung auf den mitotischen Apparat.....	22
3.2.1	Untersuchung auf stathmokinetiche Wirkung.....	22
3.2.2	Vergleichende Untersuchung der stathmokinetiche Wirkung von CdSO_4 und Colcemid.....	26

3.2.3	Erholungsversuche.....	29
3.2.3.1	Variable Expositions- und Erholungszeit.....	29
3.2.3.2	Variable Erholungszeit.....	30
3.2.3.3	Polyploide Zellen.....	30
3.2.3.4	"Hypoploide Zellen".....	33
3.2.3.5	Kleinkerne.....	33
3.3	Wirkung von $CdSO_4$ auf die Chromosomenstruktur -	33
3.3.1	Chromosomenanalyse nach Langzeitexposition.....	33
3.3.2	Chromosomenanalyse nach kurzzeitiger Exposition mit anschließender Erholung.....	35
3.3.2.1	Variable Expositions- und Erholungszeit.....	38
3.3.2.2	Variable Erholungszeit.....	38
3.3.2.3	Chromosomenanalyse polyploider Metaphasen.....	42
3.4	Modifizierende Faktoren der Aberrationsausbeute.....	42
3.4.1	Medium während der Exposition.....	42
3.4.2	Zelldichte.....	44
4.	DISKUSSION.....	45
4.1	Cytologische Effekte.....	45
4.2	Wirkung auf den mitotischen Bewegungsapparat.....	49
4.3	Wirkung auf die Chromosomenstruktur.....	52
4.4	Cadmium als Umwelttoxine.....	56
4.4.1	Schäden durch Cadmium-Intoxikation.....	56
4.4.2	Mögliche genetische Schäden durch Cadmium.....	58
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	59

1. EINLEITUNG

Die gesundheitsschädigende Wirkung von Umweltchemikalien ist seit längerer Zeit bekannt. Qualitativ lassen sich toxische, teratogene, cancerogene und mutagene Wirkungen feststellen, die unter Laboratoriumsbedingungen quantifizierbar sind.

Unter den Umweltgiften finden die Schwermetalle seit einigen Jahren eine zunehmende Beachtung. Über die cytogenetische Wirkung von Blei (3, 4, 7, 19, 20, 26, 30, 32, 40, 42), Quecksilber (11, 35, 36, 46) und Cadmium (7, 20, 31, 33, 44) liegen bereits eine Reihe von Publikationen vor. Zur Feststellung einer mutagenen Wirkung, die besonderes Interesse verdient, wurden in cytogenetischen Arbeiten überwiegend Chromosomenanalysen nach Schwermetall-Exposition von Säuger-Zellen durchgeführt. Die untersuchten Chromosomen stammten dabei aus monolayer Zellkulturen von Säugern oder von Lymphocyten, die mit verschiedenen Schwermetallsalzlösungen in vitro behandelt worden waren oder aus menschlichen oder tierischen Lymphocyten, die dem Blut exponierter Menschen oder Tiere entstammten. In Fortsetzung der von BAUCHINGER (3, 4, 40) durchgeführten Chromosomenanalysen nach Bleiexposition in vitro und in vivo soll in der vorliegenden Arbeit die cytogenetische Wirkung von Cadmium untersucht werden.

Cadmium (Cd) fällt bei der Produktion von Zink als Nebenprodukt an, weil fast alle Zinkerze geringe Mengen Cd enthalten (53). Die Produktion von Cd hängt daher nicht von der Nachfrage nach Cd, sondern von der Nachfrage nach Zink ab. Die Zunahme der Zink-Produktion führt also zwangsläufig zu einer Erhöhung der Cd-Erzeugung. Seine Hauptverwendung findet Cd als Korrosionsschutz für Eisen, Stahl etc., außerdem wird es für die Farbenherstellung (Cadmiumgelb), für Speziallegierungen mit niedrigem Schmelzpunkt und für Ni/Cd-Batterien verwendet. - Eine Folge der verbreiteten Anwendung von Cd ist dessen Anreicherung in der menschlichen Biosphäre (29, 47, 48).

Dem menschlichen Körper wird das Cd durch Wasser, Nahrung und Atemluft zugeführt. Resorbiert wird es aus der Lunge zu 10 - 40 % und aus dem Magen-Darm-Trakt zu 3 - 8 %. Nach der Resorption verschwindet Cd langsam aus dem Plasma und reichert sich hauptsächlich in Leber und Nieren, aber auch in Pankreas und Milz an. Kleinere Mengen werden in Knochenmark, Gehirn und Testes gespeichert. Die Halbwertszeit der Ausscheidung des Cd ist extrem lang. Sie wird beim Menschen auf 16 - 33 Jahre geschätzt (28).

Die größte Menge des täglich einem nicht überdurchschnittlich cadmium-exponierten Menschen zugeführten Cd erfolgt mit der Nahrung. Die durchschnittliche Zufuhr auf diesem Weg wird für die Bevölkerung der BRD auf 48 µg/die geschätzt. Das von Stadtwerken gelieferte Trinkwasser hat in Deutschland eine Cd-Konzentration von ca. 5 - 10 µg/kg. Das entspricht einer täglichen Cd-Aufnahme via Trinkwasser von 5 - 20 µg pro Person (28). Die tägliche Cd-Aufnahme mit der Atemluft schwankt zwischen 0,02 µg auf dem Lande und 0,6 µg in Großstädten.

Die Kumulation von Cd ist dafür verantwortlich, daß der Cd-Spiegel in menschlichen Organen im Laufe des Lebens ansteigt. Die Konzentration in den Nierenrinden Erwachsener differieren zwischen 30 mg/kg Feuchtgewicht in Schweden und 50 - 100 mg/kg Feuchtgewicht in Japan. Wenn man berücksichtigt, daß die durchschnittliche Cd-Aufnahme mit der Nahrung in der BRD nur 20 % unter derjenigen in Japan liegt (28), so ist zu erwarten, daß auch bei uns die allgemeine Cd-Anreicherung in den lebenswichtigen und reproduktiven Organen weiter ansteigt.

Bei der zunehmenden Kumulation von Cd in menschlichen Geweben muß natürlich die Frage untersucht werden, ob Cd außer der bekannten Toxizität (8, 15, 28, 34, 51) noch mutagene, teratogene oder cancerogene Eigenschaften hat. Cancerogene Eigenschaften hat HADDOW (1962) bei Cd-Exposition von Ratten festgestellt, die nach Injektion von CdSO_4 Sarkome entwickelten. LINDEGREN et al. (1973) stellten bei der Cadmiumsalz-Behandlung von Hefen fest, daß diese zu einem großen Prozentsatz eine stabilisierte respiratorische Defizienz entwickeln, deren anatomisches

Substrat ein Cristae-Verlust der Mitochondrien ist.

Auch mutagene Eigenschaften von Cd sind schon festgestellt worden. OEHLKERS (1953) zitiert eine unveröffentlichte Arbeit von GLÄSS, der bei Cd-Nitrat-Behandlung von *Vicia faba* eine signifikant erhöhte Zahl von Chromosomenaberrationen fand. Das positive Ergebnis dieser Arbeit bedarf aber noch ergänzender Untersuchungen an Säuger-Zellen, um die Annahme allgemeiner Mutagenität zu erhärten. SHIRAISHI et al. (1972) fanden nach CdS-Exposition von menschlichen Lymphocyten eine signifikant erhöhte Zahl von Chromosomenaberrationen. Die analysierte Zellzahl von 150 incl. Kontrollen ist für detaillierte Aussagen jedoch ziemlich gering.

Demgegenüber stellten PATON und ALLISON (1972) nach der CdCl_2 -Behandlung von menschlichen Lymphocyten und Fibroblasten keine erhöhte Chromosomenaberrationsrate fest. Sie testeten allerdings nur subtoxische Dosen von weniger als 5×10^{-8} M bei menschlichen Lymphocyten sowie weniger als 3×10^{-9} M bei menschlichen Fibroblasten. Dazu ist jedoch zu bemerken, daß in menschlichen Geweben im Laufe des Lebens wesentlich höhere Konzentrationen erreicht werden (S. 2, Abschnitt 3), so daß auch höhere Konzentrationen getestet werden müßten.

DEKNUDT et al. (1973) führten Chromosomenuntersuchungen in Lymphocyten von Personen durch, die mehreren Schwermetallen (Pb, Cd, Zn) gleichzeitig in erhöhtem Maße exponiert gewesen waren. Sie kamen zu dem Ergebnis, daß die erhöhte Chromosomenaberrationsrate nicht auf Cd, sondern auf Pb zurückzuführen sei.

Diese Ergebnisse machen weitere klärende Untersuchungen notwendig. In der vorliegenden Arbeit geschah dies mit den Fibroblasten-Zellkulturen einer etablierten Zell-Linie des Chinesischen Hamsters. Diese Kulturen sind dazu besonders geeignet, weil sie einfach zu kultivieren und wegen der geringen Chromosomenzahl schnell zu analysieren sind. Außerdem ermöglichen sie es, Störungen des mitotischen Bewegungsapparates exakt zu erfassen. Die beiden Schwerpunkte dieser Arbeit sind demnach Untersuchungen der Wirkung von Cd auf den mitotischen Apparat und auf die Chromosomenstruktur.

2 MATERIAL UND METHODEN

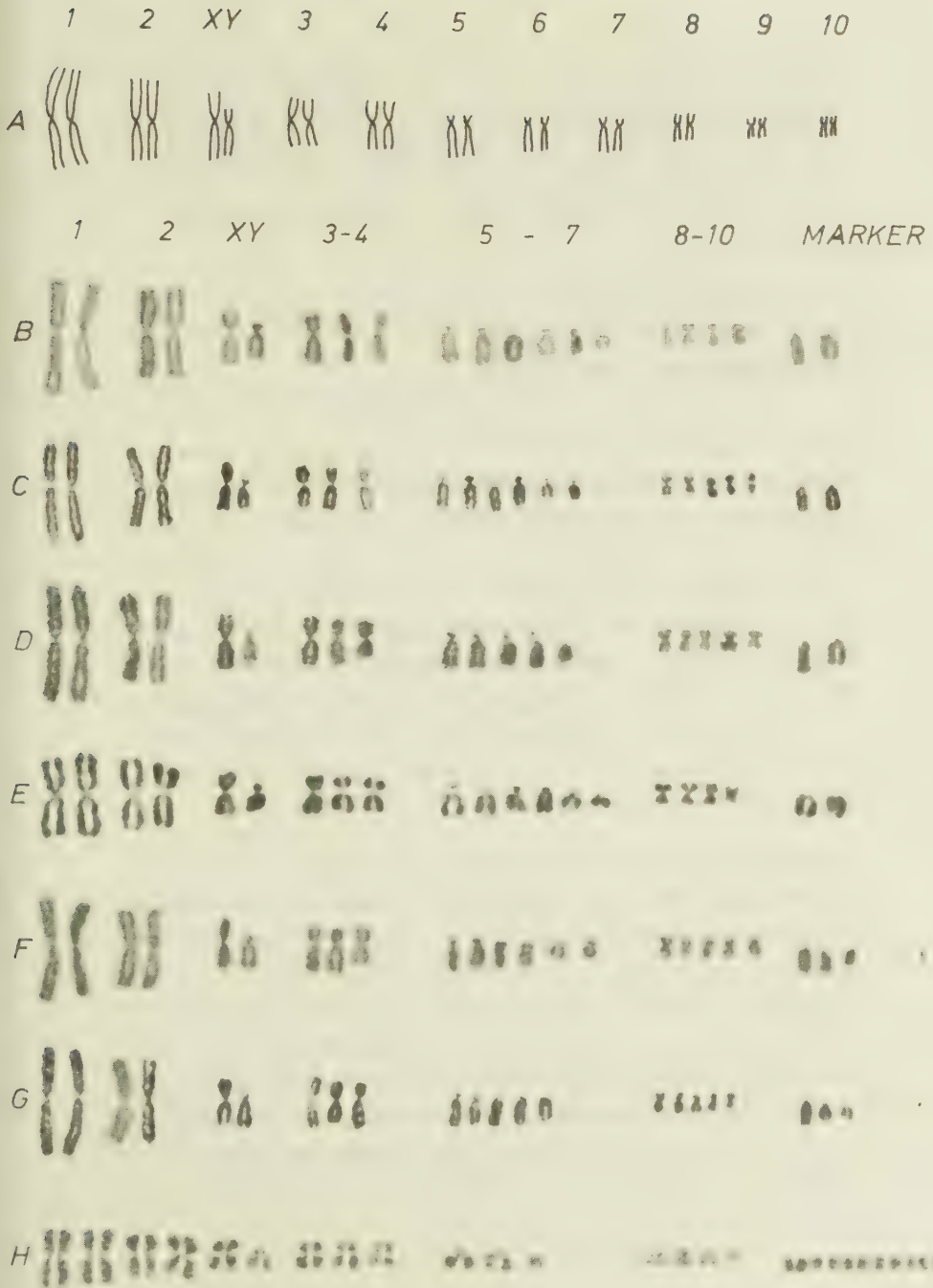
2.1 ZELLKULTUREN

Die Zellen, mit denen die Versuche durchgeführt wurden, sind etablierte Fibroblasten vom Chinesischen Hamster der Linie "Hy" (Humprey). Der Karyotyp ist männlich, die modale Chromosomenzahl beträgt 23. Bei der Chromosomenanalyse von 3000 Metaphasen ergab sich folgende Häufigkeitsverteilung für Zellen mit unterschiedlichen Chromosomenzahlen:

27 Zellen mit 20 Chromosomen	=	0,9 %
243 " 21 "	=	8,1 %
851 " 22 "	=	28,37 %
1678 " 23 "	=	55,93 %
117 " 24 "	=	3,9 %
<u>84 Zellen, polyploid</u>	=	<u>2,8 %</u>
3000		100,00 %

Auf S. 5 sind dem Idiogramm des Chinesischen Hamsters 7 Karyogramme der etablierten Zell-Linie in gleicher Vergrößerung gegenübergestellt. Daraus geht das ziemlich konstante Auftreten der vier großen Chromosomen und der Geschlechtschromosomen hervor. Von den Paaren III und IV fehlt ständig ein Chromosom, das möglicherweise nach einem Bruchstückverlust zu einem telozentrischen marker-Chromosom wurde. Die akrozentrische Chromosomengruppe V - VII ist meistens mit 5 - 6, die Gruppe VIII - X mit 4 - 5 Chromosomen vertreten. Die Gruppe der marker-Chromosomen besteht häufig aus 2 - 3 großen telozentrischen Chromosomen und einem kleinen (=minute marker) Chromosom.

Das Karyogramm H zeigt eine von dieser Charakterisierung abweichende Verteilung bei den Gruppen der akrozentrischen und der marker-Chromosomen. Vermutlich sind hier nach der Chromatidentrennung bei einigen akrozentrischen Chromosomen die Kinetochoren und die kurzen Chromosomenarme infolge starker Kontraktion nicht mehr zu erkennen, so daß sie morphologisch zu den marker-Chromosomen gezählt werden müssen. Der minute-marker



läßt oft weder Kinetochor noch Chromatiden erkennen. Er ist inkonstant, was vielleicht teilweise darauf zurückzuführen ist, daß er sich manchmal auf andere Chromosomen projiziert. Das Karyogramm H zeigt aber, daß es sich bei dem minute-marker um ein funktionsfähiges Chromosom mit zwei Chromatiden handelt, die bei der Mitose an die Tochterzellen weitergegeben werden.

2.2. NÄHRMEDIUM UND SONSTIGE BENUTZTE LÖSUNGEN

2.2.1 MEDIUM UND KÄLBERSERUM

Als Nährmedium diente eine Kombination von Eagle's Minimum Essential Medium + Hanks' Salze (SERVA GmbH & Co., Heidelberg) mit Kälberserum (BIO-CULT Laboratories, Glasgow). Das Medium enthält außer den essentiellen Aminosäuren einige Vitamine und ist durch den Gehalt an Elektrolyten isoton. Als Nährsubstrat dient 1 g Glucose/l. Dem Medium wurden nach dem Ansetzen mit aqua bidest. 100 mg Bykomycin (entspricht 66 mg Neomycinbase) pro Liter zugesetzt. Unmittelbar danach wurde es durch einen Bakterienfilter gepreßt, unter sterilen Kautelen abgefüllt und bis zum Gebrauch im Kühlschrank gelagert. Das membranengefilterte Kälberserum wurde bei -20°C gelagert und erst kurz vor dem Gebrauch aufgetaut und im Verhältnis 1 : 9 dem Medium zugesetzt. Diese Nährlösung wird im folgenden als Vollmedium bezeichnet.

Im Medium ist ein $\text{HCO}_3^-/\text{H}_2\text{CO}_3$ - Puffersystem enthalten, mit dem durch CO_2 - Begasung (95 % Luft + 5 % CO_2) ein konstanter pH-Wert während der Bebrütung erhalten werden kann.

2.2.2 SOLUTION A UND TRYPSINLÖSUNG

Für das Passagieren der Zellen wurden zwei spezielle Lösungen verwendet. Eine davon ist Solution A, eine isotone Salzlösung, die weder Mg^{2+} noch Ca^{2+} enthält. Außer einigen Elektrolyten und Phenolrot als Indikator verfügt sie noch über die Puffersysteme $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ und $\text{HCO}_3^-/\text{H}_2\text{CO}_3$. Die Trypsinlösung enthält neben Solution A als Grundsubstanz 0,2 % Trypsin (DIFCO).

2.2.3 TESTSUBSTANZ

Das zu testende Cd wurde als analytisch reines $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (MERCK) verwendet. Es wurde dem Medium bis zu einer Konzentration von 10^{-1} M (entspricht 11,24 g/l) zugesetzt. Anschließend hatte es einen Bakterienfilter zu passieren. Von dieser Stammlösung wurde nach dem Zusatz von 10 % Kälber-Serum eine Verdünnungsreihe bis 10^{-7} M (entspricht 11,24 $\times 10^{-3}$ mg/l) mit Konzentrationsgradienten vom Faktor 10 hergestellt. Diese Cd-Vollmediumlösung lagerte dann bis zum Gebrauch im Kühlschrank.

2.3 DIE HALTUNG DER STAMMKULTUREN

Das Zellreservoir für die Versuche bildeten exponentiell wachsende Stammkulturen. Die verwendeten Zellen werden dazu in gläsernen Vierkantflaschen gehalten, deren Böden sie entsprechend der eingesäten Zellmenge in einigen Tagen in einer einzigen Schicht (monolayer) bewachsen. Spätestens zu diesem Zeitpunkt müssen die Zellen mit einem speziellen Verfahren (s. u.) vom Boden gelöst und unter sterilen Bedingungen eine Zellmenge von je 50 000 - 200 000 in neue sterile Flaschen eingesät werden.

Die Zellmenge zur Zeit t_1 läßt sich mit der Formel

$$\text{Zellmenge} = z \cdot 2^{\frac{t_1 - t_0}{u}}$$

beschreiben, wobei t_0 für den Zeitpunkt der Zelleinsaat, z für die eingesäte Zellmenge und u für die Generationszeit steht. Bei Zugrundelegung einer maximalen Zellmenge von ca. 3×10^6 Zellen pro Vierkantflasche ergibt sich daraus bei einer Generationszeit von ca. 12 - 14 h die Notwendigkeit, die Zellkulturen alle 48 - 84 h zu passagieren. Als Nährlösung erhielten die Zellen 10 ml Vollmedium pro Flasche. Nach der Zelleinsaat wurde ein Luft- CO_2 -Gemisch (95 % + 5 %) so lange in die Flaschen geblasen, bis ein Umschlag des Phenolrot-Indikators nach Orange erfolgte. Anschließend wurden die Flaschen luftdicht verschlossen und bei 37°C bebrütet.

Der pH-Wert wurde wiederholt semiquantitativ mit Indikatorpapier bestimmt und ergab Werte um 6,8. Als Richtlinie zur Überwachung des pH-Wertes während der Bebrütung und der Versuche diente die Farbqualität der Nährflüssigkeit.

Die Passagierung der Zellkulturen erfolgte nach folgendem Plan:

1. Zunächst wird das alte Medium entfernt. Dann gibt man 5 ml Solution A (37°C) in die Flasche und läßt sie für 10 Minuten bei 37°C im Brutschrank. Durch die Einwirkung dieser Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freien Lösung runden sich die Zellen ab und ihre Verbindung mit dem Glasboden ist für die nachfolgende enzymatische Behandlung leichter angreifbar.
2. Solution A wird verworfen, dafür setzt man den Zellen 2 ml Trypsinlösung zu und bebrütet weitere 5 Minuten bei 37°C . Danach sind die Zellen normalerweise vom Boden gelöst.
3. Durch den Zusatz von mindestens 4 ml Vollmedium verliert das Trypsin seine enzymatische Aktivität. Dies ist auf einen im Serumanteil des Vollmediums enthaltenen Trypsin-Inhibitor zurückzuführen, der mit dem Trypsin im Verhältnis 1 : 1 einen enzymatisch inaktiven Komplex bildet.
4. Wenn eine bestimmte Zellmenge eingesät werden soll, ist eine Zählung mit der Zählkammer erforderlich. Sonst genügt eine Schätzung, die den makroskopisch sichtbaren Bodenbewuchs und die Zelldichte, die mit dem "umgekehrten Mikroskop" festgestellt werden kann, berücksichtigt.
5. Die gewünschte Zellmenge wird in saubere sterile Flaschen eingesät und das Vollmedium-Volumen auf 10 ml aufgefüllt. Nach Begasung werden die Flaschen verschlossen und bebrütet.

2.4 VERSUCHSANSATZ UND CHROMOSOMENPRÄPARATION

Für die Durchführung der Versuche wurden dreifach unterteilte Petrischalen verwendet. Auf den Boden der Petrischalen wurden Deckgläschen gelegt, auf denen die eingesäten Zellen festwachsen konnten. Vor der Zelleinsaat

wurden in jedes Petrischalenabteil 3,5 ml Vollmedium gegeben. Die Petrischalen wurden nun in ein Schliffglas gestellt (Fassungsvermögen 11 Petrischalen), bis zum Farbumschlag nach Orange begast und nach Verschuß des Schliffglases im Brutschrank auf 37°C erwärmt.

Danach wurde nach der unter "Passagierung der Zellkulturen" (Punkt 1 - 4) beschriebenen Methode eine bestimmte Zellkonzentration ermittelt. Diese Konzentration wurde nun durch Hinzufügen von Vollmedium soweit vermindert, daß sich pro ml Vollmedium die Zellmenge befand, die in ein Petrischalenabteil eingesät werden sollte (in der Regel 50 000). Daraufhin wurde jeweils 1 ml des so erhaltenen Zellkonzentrats in die vorbereiteten Petrischalenabteile gefüllt. Nach abermaliger Begasung und luftdichtem Verschießen des Schliffglases lag der Versuchsansatz vor.

Der Zusatz von 0,5 ml der Cd-Vollmediumlösung erfolgte normalerweise 24 - 40 h nach Versuchsansatz in Abhängigkeit von der geplanten Cd-Expositionszeit. Die Cd-Konzentration in den Petrischalenabteilen war dann jeweils um eine Zehner-Potenz geringer als die Cd-Konzentration der verwendeten Testlösung.

2.4.1 COLCEMIDAPPLIKATION UND HYPOTONE BEHANDLUNG

Für Chromosomenanalysen sollten möglichst viele gut gespreitete Metaphasen auf den Präparaten vorhanden sein. Zur Anreicherung der Metaphasen wurden deshalb 2 h vor Beendigung des Versuches 0,2 µg Colcemid/ml Medium zugesetzt. Durch anschließende hypotone Behandlung wird eine gute Spreitung erzielt. Zellen, die sich gerade in der Mitose befinden, beginnen zu quellen. Nach der Fixierung platzen sie beim Trocknungsprozeß auf den Deckgläschen, so daß die Chromosomen in gespreiteten Metaphasen liegen und einer exakten Analyse zugänglich sind.

Zur hypotonen Behandlung wurde eine Na₃-Citrat-Lösung verwendet. Dabei ergab eine Na₃-Citrat-Konzentration von 0,85 % bei einer Einwirkungszeit von 20 Minuten optimal gespreitete Metaphasen.

2.4.2 FIXIERUNG, FÄRBUNG UND EINDECKEN

Die Zellen wurden direkt auf den Deckgläschen fixiert. Als Fixativ diente ein Gemisch aus Äthanol und Eisessig im Verhältnis 3 : 1. Die Fixierung erfolgte langsam. Dazu wurde zweimal je ein Drittel der Lösung in den Petrischalen-Segmenten gegen Fixativ ausgewechselt, dann die ganze Fixierflüssigkeit entfernt und durch reines Fixativ ersetzt. Die Gesamtfixierungszeit betrug 45 Minuten.

Danach mußten die Deckgläschen mindestens 15 Minuten lufttrocknen. Die Deckglaspräparate wurden nun für 6 Minuten mit Orcein gefärbt. (2 %-ige essigsäure Orceinlösung). Nach Entwässerung in einer Alkohol-Xylol-Reihe (96 % Äthanol, Isopropanol, Isopropanol : Xylol = 1 : 1, 2 x Xylol) wurden sie zu Dauerpräparaten verarbeitet. Dazu wurde ein Tropfen Caedax auf einen sauberen Objektträger gegeben und das Deckglaschenpräparat mit der angewachsenen Zellschicht nach unten leicht aufgedrückt.

2.4.3 EXPERIMENTE

2.4.3.1 Analyse struktureller Chromosomenaberrationen

Für die Analyse struktureller Chromosomenaberrationen wurden die Präparate nach den unter 2.4.1 und 2 dargelegten Methoden angefertigt. Die Beendigung der Versuche erfolgte entweder unmittelbar nach CdSO_4 -Exposition oder nach verschieden langer Erholung von akuter CdSO_4 -Exposition.

In den Versuchen mit Erholung von akuter CdSO_4 -Exposition sollte das Cadmium möglichst vollständig von den Zellen entfernt werden. Zu diesem Zweck wurden die Deckgläschen aus den Petrischalen entnommen, jeweils mit 1 - 2 ml Medium abgespült und dann in vorbereitete neue Petrischalen mit erwärmtem frischem Vollmedium gelegt.

2.4.3.2 Analyse von Störungen des mitotischen Bewegungsapparates

Für die spezielle Analyse des mitotischen Bewegungsapparates ist es notwendig, nicht nur Metaphasepräparationen zu untersuchen, sondern auch andere Mitosestadien zu erfassen. In entsprechenden Versuchen wurde deshalb weder Colcemid zugegeben, noch eine hypotone Behandlung durchgeführt. Das Nährmedium wurde nur gegen eine isotonische Hank's Lösung (37°C) ausgetauscht und danach sofort fixiert.

2.5 METHODEN DER STATISTISCHEN AUSWERTUNG

Für die Erfassung von Mitosehemmung, Metaphasenanreicherung etc. durch Cd-Einwirkung wurde der Mitoseindex (Metaphasenindex etc.) herangezogen. Diese Indices wurden durch Zählung der Mitosen (bzw. Metaphasen etc.) pro 2×1000 Zellen in jeweils zwei verschiedenen Präparaten ermittelt. Daraus wurde ein Mittelwert gebildet, für den die Standardabweichung s berechnet wurde.

Der mittlere Polyploidieindex wurde erfaßt, indem der Anteil der Metaphasen mit 8 und mehr großen Chromosomen (s. S. 5) pro 2×1000 Metaphasen auf jeweils zwei verschiedenen Präparaten bestimmt wurde.

Zum Vergleich der Mitoseindices etc. von unterschiedlich behandelten Zellen wurde der Mann-Whitney-Test (25) verwendet, ein reiner Rangordnungstest, der keine Hypothesen über die Verteilung der Grundgesamtheit benützt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit $P < 0,05$ wurde als Kriterium für signifikante Unterschiede zugrundegelegt.

3. VERSUCHSERGEBNISSE

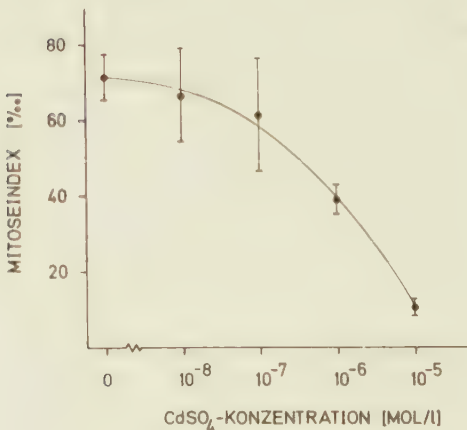
3.1 CYTOTOXIZITÄT VON CdSO_4

3.1.1 BESTIMMUNG DER LETALKONZENTRATION NACH LANGZEIT-EXPOSITION

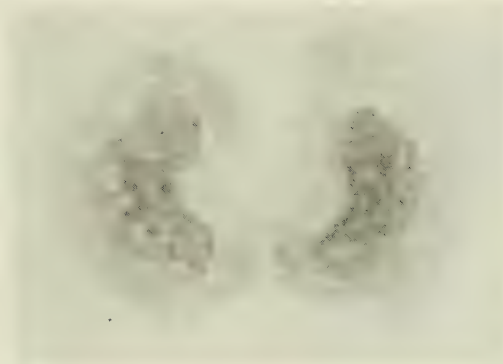
Das erste Ziel war die Ermittlung der cytotoxischen und der letalen CdSO_4 -Konzentration für die benutzten Zellen. Dazu wurde den Zellen nach dreißigstündigem Wachstum für 16 h eine CdSO_4 -Lösung zugesetzt. Es wurden Konzentrationsstufen von 10^{-8} - 10^{-5} Mol/l getestet.

Die Expositionszeit von 16 h war gewählt worden, um alle Zellen über einen kompletten Zellzyklus von 12 - 14 h zu behandeln. Infolge einer starken Mitosehemmung durch CdSO_4 und der damit verbundenen Verlängerung der Generationszeit wurde dieses Ziel bei der Behandlung mit höheren CdSO_4 -Konzentrationen wahrscheinlich nicht erreicht.

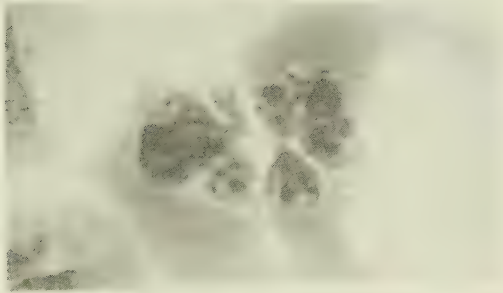
Als Testkriterium wurde der stathmokinetiche Mitoseindex herangezogen. Die Ergebnisse zeigt Figur 1. Der Mitoseindex ist bei CdSO_4 -Konzentrationen ab 10^{-6} Mol/l signifikant erniedrigt. Als letal erweist sich unter den gleichen Bedingungen eine CdSO_4 -Konzentration von 10^{-5} Mol/l. Die Zellkerne sind zum überwiegenden Teil stark deformiert (Tafel 1 (S. 13), Abb. a - c).



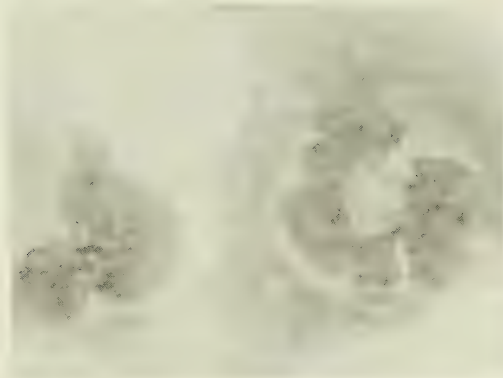
Figur 1:
Stathmokinetiche
Mitoseindex ($\pm$ Stan-
dardabweichung) nach
16-stündiger CdSO_4 -
Exposition (2 h vor
Fixierung wurden 0,2 μg
Colcemid/ml zugesetzt).



a



b



c

Tafel 1: a - c Kerndeformierung.

In den vorhandenen Mitosen zeigen die Chromosomen allgemein eine aufgelockerte Struktur. Oft sind die Chromatiden getrennt. In vielen Mitosen sind Chromosomenaberrationen zu sehen, die teilweise so zahlreich sind, daß die Chromosomen partiell oder total pulverisiert sind (Tafel 2 (S. 15), Abb. b - e).

Nach einer Langzeit- CdSO_4 -Behandlung über mehrere Zellzyklen hinweg wurde das Wachstum von Hamsterzell-Kolonien untersucht. Dazu wurden in jede Petrischalenabteilung 300 Zellen eingesät, die 5 Tage lang ungestört Kolonien bilden konnten. Dann wurden CdSO_4 -Lösungen bis zu Konzentrationsstufen von 1×10^{-6} - 9×10^{-6} Mol/l zugegeben.

Nach 48stündiger CdSO_4 -Exposition wurden die Zellen ohne vorherige Colcemidapplikation und hypotone Behandlung fixiert und gefärbt. Auf der Abb. 1 ist bereits makroskopisch zu sehen, daß mit zunehmender CdSO_4 -Konzentration sowohl die Zahl der Kolonien als auch deren Größe abnimmt. Es sind aber trotzdem auch bei der stärksten verwendeten Konzentration von 9×10^{-6} Mol CdSO_4 /l noch einige große Kolonien vorhanden.

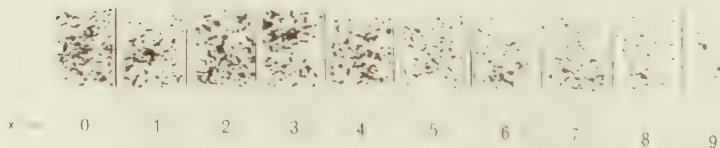
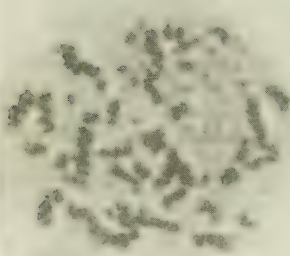
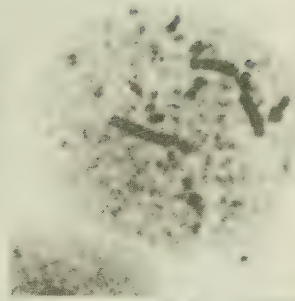


Abb. 1: Cytotoxischer Effekt von $x \cdot 10^{-6}$ molarer 48stündiger CdSO_4 -Exposition. Dargestellt ist die Kolonien-Bildung von Hamster-Zellen in orceingefärbten Präparationen.

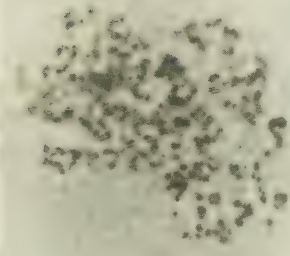
a



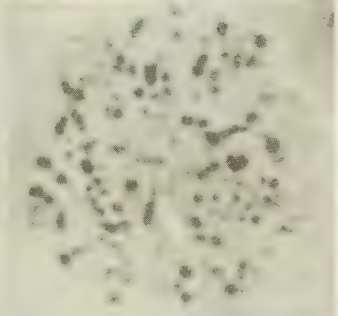
b



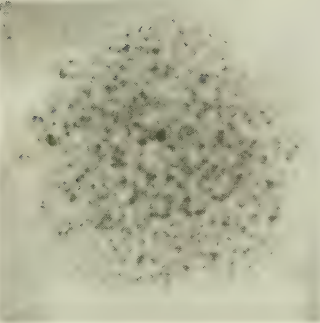
c



d



e



f



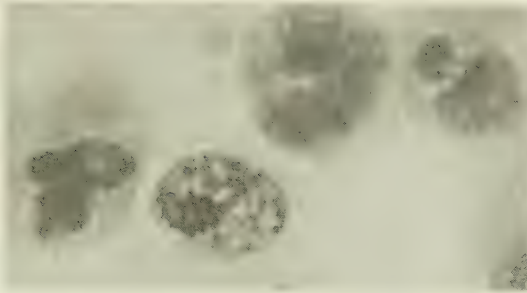
Tafel 2: a - e diffuse Veränderungen der Chromosomenstruktur.
a abnorme Spiralisierung, b partielle Pulverisierung,
c - e totale Pulverisierung, f kondensiertes Chromo-
somenmaterial ohne sichtbare Kernmembranbildung.

Die mikroskopische Durchmusterung der Präparate läßt erkennen, daß die Zellen durch die CdSO_4 -Behandlung, entsprechend ihrer Position zu anderen Zellen unterschiedlich geschädigt sind. Zellen am Rand von Kolonien sowie Zellen, die in kleineren Gruppen zusammenliegen, sind nach Behandlung mit höheren CdSO_4 -Konzentrationen stärker geschädigt als Zellen innerhalb von größeren Zellkolonien. Normale Mitosefiguren sind nur innerhalb von größeren Zellkolonien zu sehen, wogegen am Rand der Kolonien und in kleineren Zellgruppen an Stelle von normalen Mitosefiguren nur solche mit pulverisierten Chromosomen zu registrieren sind (Tafel 2 (S. 15), Abb. b - e).

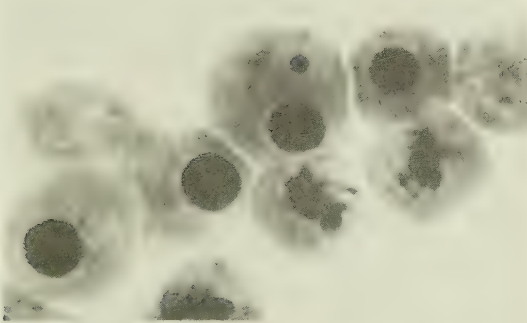
3.1.2 UNTERSUCHUNG ZELLKERNMORPHOLOGISCHER VERÄNDERUNGEN NACH HOCHKONZENTRIERTER CdSO_4 -BEHANDLUNG OHNE ERHOLUNG

Die Zellschädigung durch CdSO_4 ist stark von der Expositionszeit abhängig. Eine 10^{-4} molare CdSO_4 -Exposition (Fixierung etc. ohne vorherige Colcemid- und hypotone Behandlung) bewirkte bis zu einer Dauer von 2 h weder Zellkerndeformierungen noch Verklumpung von Chromosomen. Nach vierstündiger Exposition zeigten 1000 von 2703 Zellen starke strukturelle Veränderungen (ca. 37 %). 839 Zellkerne waren stark deformiert (Tafel 1 (S. 13), Abb. a - c, (Tafel 3 (S. 17), Abb. a), 39 Zellen hatten hyperchromatische Karyomeren bzw. Kleinkerne (Tafel 3 (S. 17), Abb. b: Bildmitte, Abb. c: oben links), 16 Zellkerne waren hyperchromatisch (Tafel 3 (S. 17), Abb. b, c) und 106 Mitosen waren partiell oder total verklumpt (Tafel 3 (S. 17), Abb. b und c).

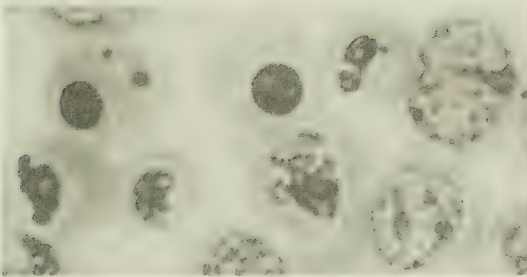
Nach weiteren 4 h CdSO_4 -Exposition waren alle oben beschriebenen Veränderungen noch stärker ausgeprägt und mit Ausnahme von verklumpten Chromosomen in höheren Anteilen vertreten. Von 1684 Zellen zeigten 1000 ein stark von der Norm abweichendes Aussehen (ca. 60 %). Davon hatten 844 stark deformierte Zellkerne, 106 Zellkerne waren hyperchromatisch und 42 Zellen enthielten hyperchromatische Karyomeren bzw. Kleinkerne. Total verklumpte Mitosefiguren waren nur noch 8 zu sehen.



a



b



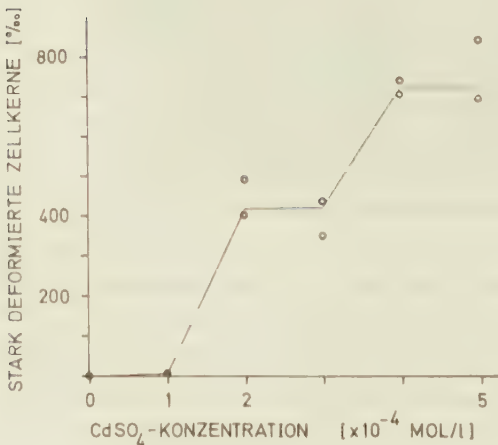
c

Tafel 3: a - c strukturelle Kernveränderungen und Chromosomenverklumpung
a Bildmitte: Kern mit stark strukturiertem Kernmaterial und fusionierten Nukleolen, rechts und links deformierte Kerne, b und c: pyknotische und hyperchromatische Kerne mit Zusammenballung des Chromatinmaterials, außerdem verklumpte Chromosomen (b unten rechts und c Mitte und unten links), c rechts im Bild: Kerne mit radiär von den Nukleolen ausgehenden Strukturen.

Von den normal geformten Zellkernen hatte keiner eine typische Struktur wie die der Kerne auf Abb. a der Tafel 4 (S. 19). In den meisten waren entweder keine Nukleolen mehr zu erkennen oder es fanden sich nur kleine, unscharf begrenzte Nukleolen-Reste (Tafel 2 (S. 15), Abb. f: rechts, Tafel 4 (S. 19), Abb. b und c).

3.1.3 UNTERSUCHUNG ZELLKERNMORPHOLOGISCHER VERÄNDERUNGEN NACH HOCHKONZENTRIERTER EINSTÜNDIGER CdSO_4 -BEHANDLUNG UND ANSCHLIESSENDER ERHOLUNG

Eine einstündige CdSO_4 -Exposition mit höheren Konzentrationen kann so starke Veränderungen der Zellkernstruktur hervorrufen, daß diese noch nach 21 h Erholung (Fixierung etc. nach Colcemid- und hypotoner Behandlung) festzustellen sind. Bilder solcher stark deformierten Zellkerne zeigen Tafel 4 (S. 19), Abb. b, c, Tafel 1 (S. 13), Abb. a - c, Tafel 5 (S. 21), Abb. a - c. Die Abhängigkeit der Zellkerndeformierung von der CdSO_4 -Konzentration während der einstündigen Exposition (1×10^{-4} - 5×10^{-4} Mol/l) zeigt Figur 2: Die Zunahme der stark deformierten Zellkerne mit steigender CdSO_4 -Konzentration ist nicht kontinuierlich, sondern stufenförmig.

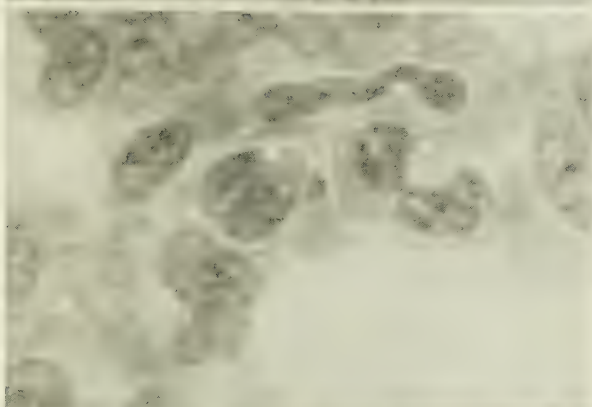


Figur 2:

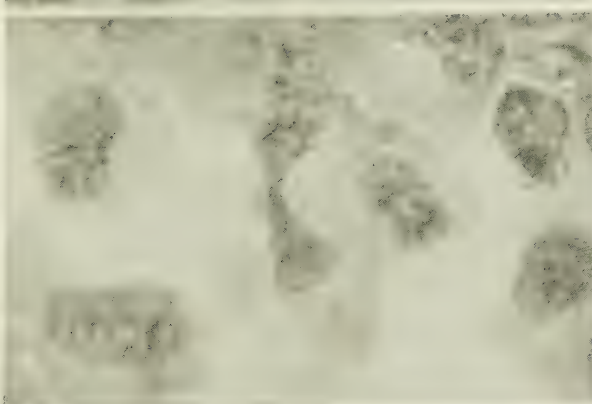
Anstieg des Anteils stark deformierter Zellkerne mit steigender CdSO_4 -Konzentration (1 h CdSO_4 -Exposition, anschließend 21 h Erholung). Die Kreise markieren jeweils das Ergebnis einer Auswertung von 1000 Zellkernen.



a



b



c

Tafel 4: a normale Fibroblasten mit kräftigen Nukleolen, b und c Kerndeformierungen, Nukleolen teilweise nicht sichtbar, teilweise klein und unscharf begrenzt.

Die Unterscheidung zwischen normalgeformten und stark deformierten Zellkernen ist nicht immer eindeutig möglich, weil es zwischen beiden Gruppen Übergangsformen gibt. Um eine subjektive Erwartungshaltung bei der Auswertung auszuschalten, wurde nach der ersten Auswertung von jeweils 1000 Zellen eine zweite analoge Zählung vorgenommen, bei der aber dem Auswertenden die Zuordnung der Präparate nicht bekannt war. - Die beiden Ergebnisse stimmen jedoch gut überein.

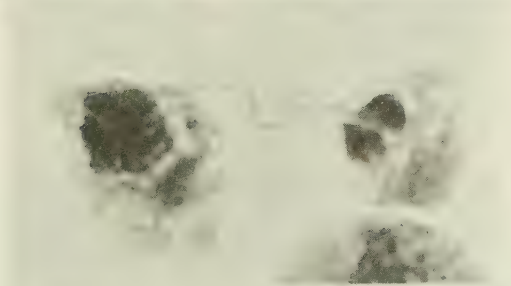
Das Auswertungsergebnis zeigt Tab. 1. Neben der oben schon erwähnten Zunahme der stark deformierten Zellkerne steigt auch der Anteil der "überalterten" Mitosefiguren (=Mitosefiguren mit verkürzten Chromosomen und zumeist getrennten Chromatiden) und der partiell pulverisierten Mitosen mit steigender CdSO_4 -Konzentration an, während C-Mitosen bei höheren Konzentrationen als 10^{-4} Mol CdSO_4 /l nicht mehr nachweisbar waren.

Tabelle 1: Auswertung von je 2 x 1000 Zellen nach morphologischen Kriterien. Konstante Versuchsbedingungen: Einsaat je Petrischalenabteil 40 000 Zellen, nach 24 h Wachstum 1 h CdSO_4 -Exposition, anschließend 21 h Erholung, Fixierung nach Metaphasen-Arretierung durch 0,2 µg Colcemid/ml und 20 Minuten hypotoner Behandlung mit 0,85 % -igem Na_3 -Citrat. Variable Bedingung: CdSO_4 -Konzentration.

CdSO_4 (Mol/l)	Normal ge- formte Zellkerne	Stark de- formierte Zellkerne	Hyper- chromat. Zellkerne	C-Mi- tosen	"Überal- terte" Mitosen	Kondens. Chr.- material ohne Kernmembran
1×10^{-4}	1794	18	10	149	28	1
2×10^{-4}	1063	885	10	-	32	10
3×10^{-4}	1156	783	6	-	31	24
4×10^{-4}	495	1448	4	-	26	27
5×10^{-4}	370	1534	3	-	43	50
Kontr.	1760	-	4	236	-	-



a



b



c

Tafel 5: a - c Kerndeformierung, b und c zeigen jeweils zwei Kernteile, die durch schlauchförmig auseinandergezogene Membranstrukturen verbunden sind.

3.1.4 UNTERSUCHUNG DER MITOTISCHEN AKTIVITÄT 15 - 21 h NACH 10^{-4} MOLARER ZWEISTÜNDIGER CdSO_4 -BEHANDLUNG

Der Mitoseindex-Mittelwert sinkt im Anschluß an eine zweistündige CdSO_4 -Exposition von 2,6 % nach 15 h Erholung auf 0,9 % nach 21 h Erholung. Die statistische Auswertung ergibt sowohl von 15 bis 18 h als auch von 18 bis 21 h einen signifikanten Abfall des Mitoseindex ($P = 0,029$).

Die Chromosomen in den Mitosefiguren machen einen "überalterten" Eindruck. Sie sind in der Regel verkürzt und oft in die Chromatiden auseinandergefallen wie ein Karyogramm H auf S. 5. Zahlreiche Chromosomen sind mehr oder weniger stark entspiralisiert und haben eine aufgelockerte Struktur (Tafel 2 (S. 15), Abb. a).

3.2 WIRKUNG AUF DEN MITOTISCHEN APPARAT

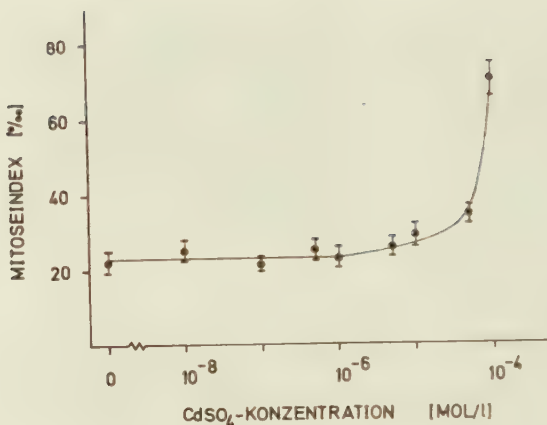
3.2.1 UNTERSUCHUNG AUF STATHMOKINETISCHE WIRKUNG

Mit dem folgenden Versuch sollte getestet werden, ob Cadmium auf den mitotischen Bewegungsapparat der Fibroblasten des Chinesischen Hamsters einwirkt und ihn partiell oder total zerstört (Stathmokinese). Solche Störungen werden von verschiedenen Chemikalien verursacht, insbesondere sind Colchizin und Colcemid wegen ihrer stathmokinetischen Wirkung bekannt. Deshalb werden entsprechend gestörte Mitosen auch als G-Mitosen bezeichnet (3, 23).

Für die Versuchsdurchführung wurden die Zellen nach 42 h Bebrütung für 3 h CdSO_4 -Konzentrationen von 10^{-8} - 10^{-4} Mol/l exponiert. Anschließend erfolgten Fixierung etc. ohne vorherige Colcemid-Applikation und hypotone Behandlung. Das Ergebnis der Auswertung der Mitoseindizes zeigt die Kurve der Figur 3. Daraus geht hervor, daß der Mitoseindex bei höheren CdSO_4 -Konzentrationen ansteigt und bei 10^{-4} Mol/l etwa dreimal so hoch ist wie bei den Kontrollen.



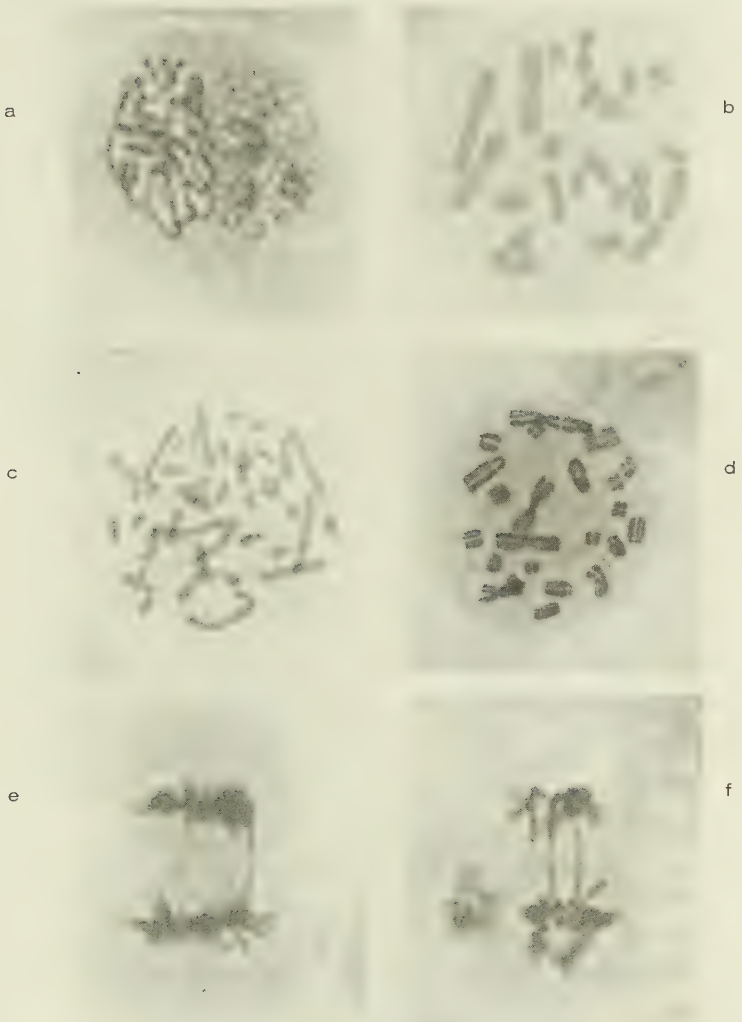
Tafel 6: Normale Mitosephasen, a Prophasen, b Metaphasen in Seitenansicht, c Metaphase in Polansicht, d Anaphase, e frühe Telophase, f späte Telophase.



Figur 3:
Stathmokinetischer
Effekt durch drei-
stündige CdSO_4 -Expo-
sition (Mitoseindex-
Mittelwerte $\pm$ Stan-
dardabweichung).

Die statistische Auswertung ergibt für die einzelnen Mitosephasen eine unterschiedliche Störanfälligkeit. Der Anteil der Metaphasen ist schon bei der Konzentration von 5×10^{-6} Mol CdSO_4 /l signifikant höher als der Metaphasen-Anteil der Kontrollen und aller mit geringeren Konzentrationen behandelten Zellen ($P=0,014$). Eine signifikante Verringerung der Ana- und Telophasen stellt sich nach der Behandlung mit 10^{-5} Mol CdSO_4 /l und höheren Konzentrationen ein ($P = 0,014$). Für den Prophasenanteil ergibt sich erst ab Konzentrationen von 5×10^{-5} Mol CdSO_4 /l eine signifikante Verringerung ($P = 0,029$).

Das Ergebnis einer Analyse von 1000 Mitosefiguren je Konzentrationsstufe zeigt Tab. 2. Bei der Auswertung wurden sämtliche Mitosefiguren erfaßt. Beispiele für normale Mitosefiguren sind auf den Abb. a - f der Tafel 6 (S. 23) gegeben. Beispiele für atypische Mitosefiguren: C-Prophase (Tafel 7 (S. 25), Abb. a: links), C-Metaphase (Tafel 7 (S. 25), Abb. b), Ana- und Telophase-Brücken (Tafel 7 (S. 25), Abb. e, f), Chromosomenverklumpung (Tafel 8 (S. 27), Abb. a).



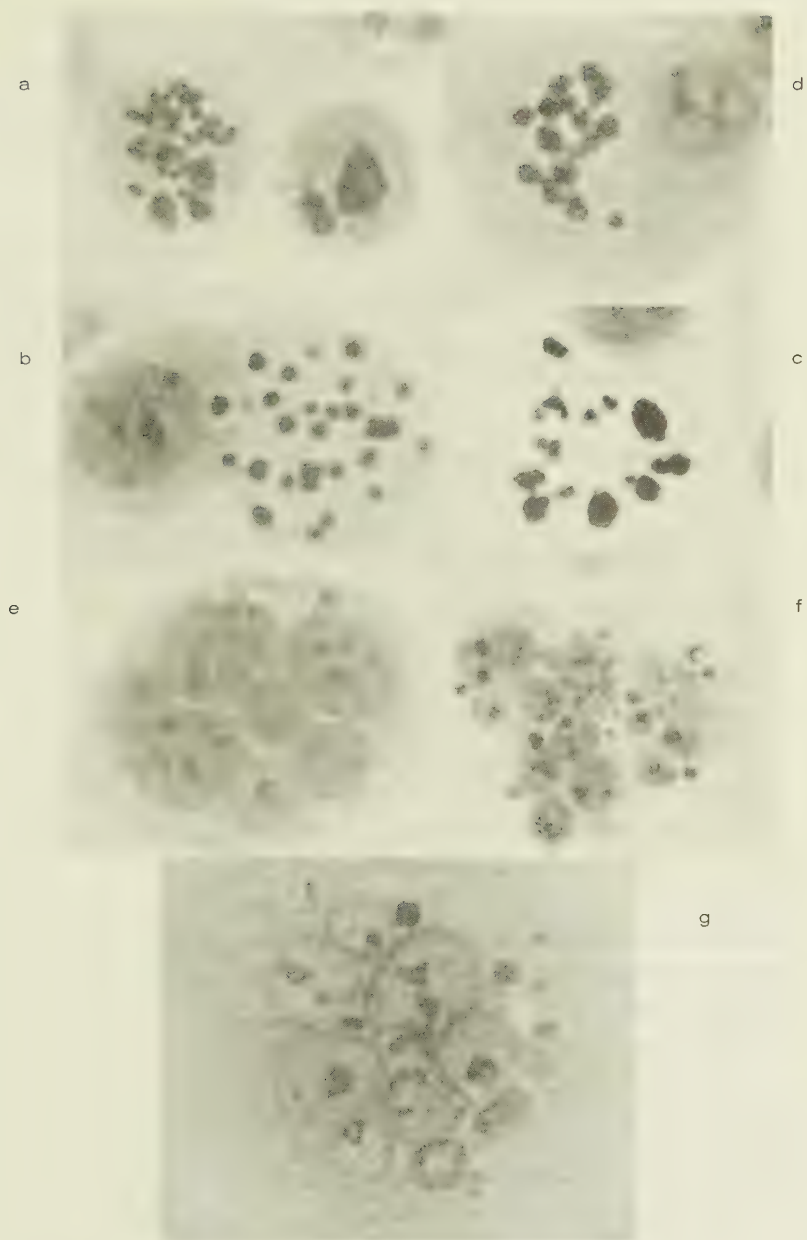
Tafel 7: a links im Bild C-Prophase, rechts normale Prophase, b C-Metaphase mit einer Chromosomenzahl im diploiden Bereich, c tetraploide C-Metaphase, d Endoreduplikation, e und f Ana-Telophasen-Brücken.

Tabelle 2: Chromosomenanalyse von jeweils 1000 mitotischen Zellen (Cadmium-Applikation 3h vor Fixierung).

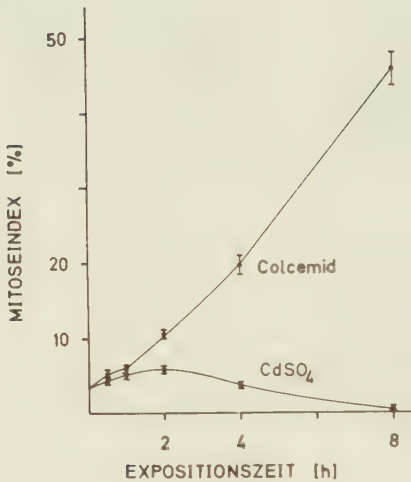
Cd-Konzentration (Mol/l)	Normale Zellen			Gestörte Zellen		
	Prophasen	Meta-phasen	Ana-u. Telo-phasen	C-Prophasen	C-Meta-phasen	Anaphase-Struktur Brücken
10^{-8}	109	682	176	7	25	1
10^{-7}	107	650	209	5	27	2
$10^{-6,3}$	130	688	157	7	16	2
10^{-6}	81	684	141	13	78	3
$10^{-5,3}$	76	645	156	19	100	4
10^{-5}	76	298	118	12	496	-
$10^{-4,3}$	16	306	41	-	635	2
10^{-4}	-	-	8	-	992	-
Kontrolle	115	695	173	3	14	-

3.2.2 VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNG DER STATHMOKINETISCHEN WIRKUNG VON CdSO_4 UND COLCEMID

Eine Untersuchung der stathmokinnetischen Wirkung von CdSO_4 und Colcemid wurde vorgenommen, um die Wirkung der beiden Stoffe miteinander zu vergleichen. Die CdSO_4 -Konzentration von 10^{-4} Mol/l wurde gewählt, weil sie in einem früheren Versuch eine starke Mitosenanreicherung ergeben hatte (Figur 3), und die Colcemid-Konzentration von 0,1 µg/ml sich als maximal stathmokinnetisch wirksam erwies. Die Expositionszeit betrug 1/2, 1, 2, 4 und 8 h. Das Ergebnis der Auswertung der Mitoseindizes zeigen die Kurven auf Figur 4.



Tafel 8: a Chromosomenverklumpung, b - d verschiedene Stufen der Kleinkernbildung, e - g Karyomeren und Kleinkerne.



Figur 4:
Vergleichende Untersuchung
der stathmokineticen Wir-
kung von Colcemid ($0,1 \mu\text{g}/\text{ml}$) und CdSO_4 (10^{-4} Mol/l),
abgebildet sind die Mitose-
index-Mittelwerte $\pm$ Standard-
abweichung.

In dem beschriebenen Versuch erfolgte bei den colcemidbehandelten Zellen ein Anstieg des stathmokineticen Mitoseindex, der annähernd proportional mit zunehmender Expositionszeit bis zu 8 h verlief. Der geringere Anstieg zu Beginn der Exposition ist vermutlich durch Abkühlung der Kulturen während der Versuchsdurchführung bedingt. Die Behandlung der Zellen mit CdSO_4 führte hingegen nur in den ersten 2 h zu einem Anstieg des stathmokineticen Mitoseindex (Figur 4). Schon nach einer halbstündigen Exposition ist der Metaphasen-Index gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht ($P=0,014$), während sich ein signifikanter Abfall des Ana- und Telophasen-Index erst nach 1 h ($P=0,029$) und des Prophasen-Index erst nach 2 h ($P=0,014$) einstellt.

Nach 4 h ist der stathmokinetiche Mitoseindex gegenüber der Expositionszeit von 2 h bereits wieder abgefallen. Prophasen sind nicht mehr nachweisbar, und die Chromosomen in den Mitosefiguren sind teilweise oder alle miteinander verklumpt (Tafel 3 (S. 17), Abb. b und c, Tafel 8 (S. 27), Abb. a). Die zellkernmorphologischen Veränderungen sind schon unter 3.1.2 beschrieben.

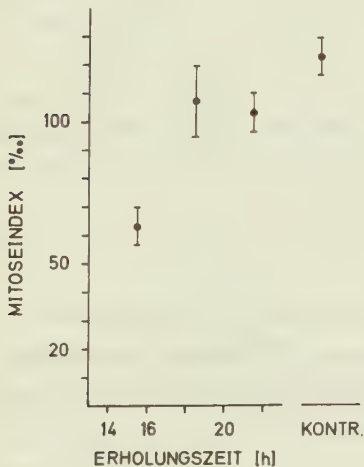
3.2.3 ERHOLUNGSVERSUCHE

Weitere Versuche sollten Aufschluß darüber erbringen, wie sich Zellen nach akuter CdSO_4 -Exposition im Verlauf der Zeit erholen. Als Kriterium für Erholung wurde der stathmokinetiche Mitoseindex (Colcemidapplikation und hypotone Behandlung vor Fixierung) herangezogen.

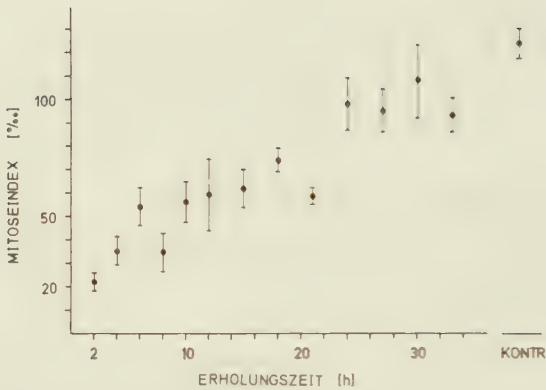
3.2.3.1 Variable Expositions- und Erholungszeit

Zunächst wurden in einem Versuch die Zellen für 1/2, 1 und 2 h einer 10^{-4} molaren CdSO_4 -Lösung exponiert. Nach Erholungszeiten von 15 - 21,5 h erfolgten Fixierung etc.

Die schnellste Erholung zeigten die Zellen, die nur für 1/2 h mit CdSO_4 behandelt worden waren (Figur 5). Die doppelt so lange behandelten Zellen erholten sich wesentlich langsamer (mittlerer Abschnitt von Fig. 6 mit 15, 18, 21 h Erholung, die übrigen Ergebnisse in Fig. 6 wurden in einem zweiten Versuch ermittelt). Nach zweistündiger CdSO_4 -Exposition konnten sich die Zellen auch im Verlauf von 20 h nicht erholen (unter 3.1.4 beschrieben).



Figur 5:
Mitoseindex-Mittelwerte
($\pm$ Standardabweichung)
im Erholungsversuch nach
0,5-stündiger Exposition
in 10^{-4} molarer CdSO_4 -
Lösung.



Figur 6: Mitoseindex-Mittelwerte ($\pm$ Standardabweichung) im Erholungsversuch nach einstündiger Exposition in 10^{-4} molarer CdSO_4 -Lösung.

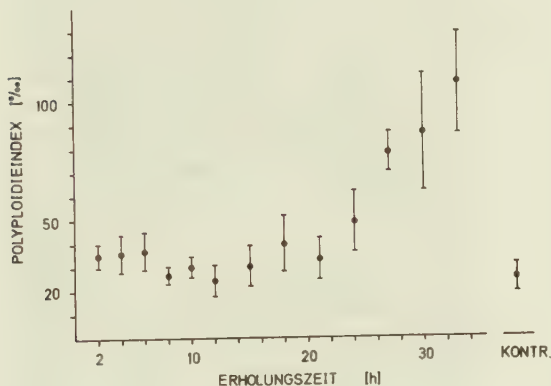
3.2.3.2 Variable Erholungszeit

Da eine einstündige Behandlung mit 10^{-4} molarer CdSO_4 -Lösung eine starke Mitosehemmung ergeben hatte, wurde in einem weiteren Versuch nach einer solchen Exposition die Erholungszeit zwischen 2 und 12 sowie 24 und 33 h variiert. Das Ergebnis der Auswertung der stathmokineticischen Mitoseindizes zeigt Figur 6. Daraus geht hervor, daß die mitotische Aktivität mit zunehmender Erholungszeit zunimmt. Aber auch nach 33 h Erholung ist der stathmokineticische Mitoseindex noch signifikant geringer als derjenige der Kontrollen ($P=0,014$).

3.2.3.3 Polyploide Zellen

Die Analyse des Polyploidieindex wurde aus zwei Gründen durchgeführt: einmal sollte ermittelt werden, ob polyploide Zellen bezüglich einer Mitosehemmung ebenso empfindlich wie Zellen im diploiden Bereich sind. Zweitens

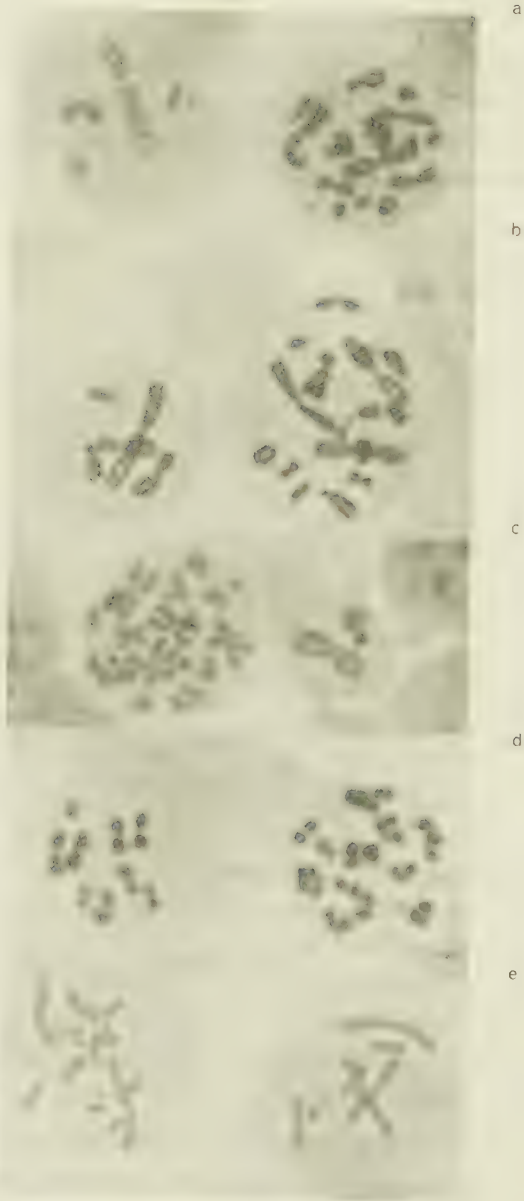
galt es festzustellen, ob die stathmokinetiche Wirkung der einstündigen CdSO_4 -Exposition nach einer Latenzzeit (= ein Zellzyklus, von Mitosephase zu Mitosephase) zu einem Anstieg des Polyploidieindex führt. Das Auswertungsergebnis zeigt Figur 7.



Figur 7: Polyploidieindex-Mittelwerte ($\pm$ Standardabweichung) im Erholungsversuch nach einstündiger Exposition in 10^{-4} molarer CdSO_4 -Lösung.

Ein signifikant erhöhter Polyploidieindex verglichen mit den Kontrollen ergab sich nach Erholungszeiten von 2 h ($P=0,004$), 4 h ($P=0,014$), 6 h ($P=0,004$), 10 h ($P=0,036$) sowie 18 - 33 h ($P=0,002$). Ein Vergleich der Polyploidieindices nach Erholungszeiten von 2 - 6 h mit jenen nach 8 - 15 h zeigt, daß die Zahl der polyploiden Zellen im späteren Zeitabschnitt signifikant niedriger ist ($P<0,025$) und sich nicht von der der Kontrollen unterscheidet.

Nach Erholungszeiten von 24 - 33 h wurden außerdem einige Mitosefiguren mit Diplochromosomen (Endoreduplikation) beobachtet (Tafel 7 (S. 25), Abb. d). Wegen der geringen Rate solcher Mitosefiguren war eine detaillierte Analyse jedoch nicht möglich.



Tafel 9: a - e jeweils 2 Zellen in C-Metaphase, die zusammen eine Chromosomenzahl im diploiden Bereich aufweisen. b zeigt außer 2 chromosomenhaltigen Zellen eine dritte chromosomenfreie Zelle, d teilweise sind die Chromatiden getrennt (C-Anaphase), e mit multiplen strukturellen Chromosomenaberrationen.

3.2.3.4 "Hypoploide Zellen"

In den ersten 12 h nach CdSO_4 -Exposition fanden sich Zellpaare, die dicht nebeneinander lagen und zusammen eine Chromosomenzahl von 20 - 24 aufwiesen (Tafel 9 (S. 32), Abb. a - d). Sie sind offensichtlich aus einer einzigen Zelle hervorgegangen, bei der die Cytokinese vor der normalerweise vorangehenden Karyokinese erfolgt ist.

Nach 6 - 10 h Erholungszeit fanden sich ca. 3 - 5 solcher Zellpaare pro 1000 Metaphasen. Wenn solche Zellpaare nach längeren Erholungszeiten festgestellt wurden, so waren die Chromatiden oft getrennt (Tafel 9 (S. 32). Abb. d). Einige solcher Mitosefiguren wiesen auch strukturelle Chromosomenaberrationen auf (Tafel 9 (S. 32), Abb. e). In den Kontrollen wurden derartige Zellpaare nicht beobachtet.

3.2.3.5 Kleinkerne

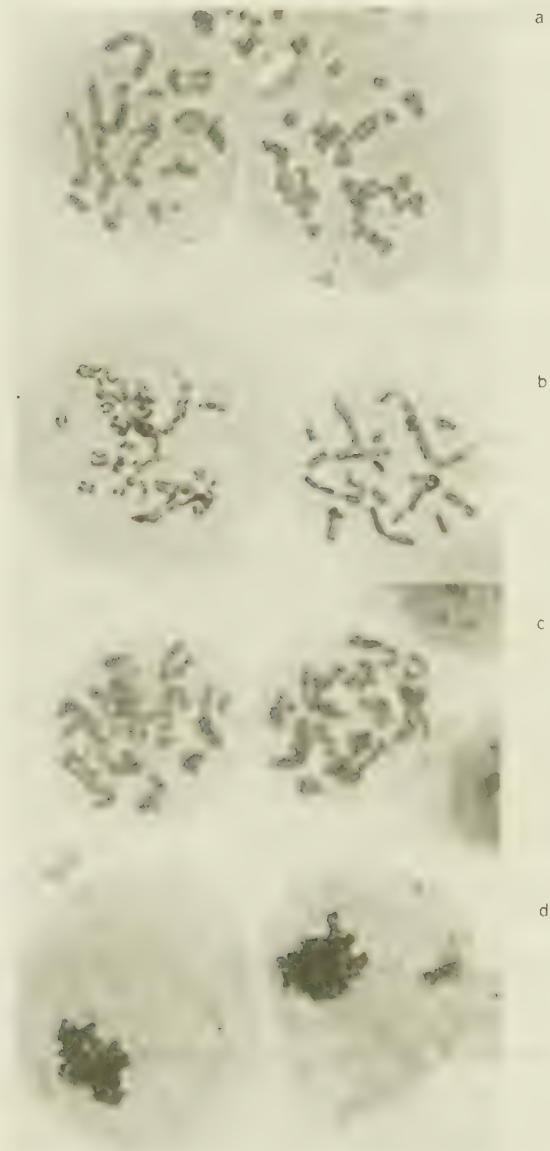
Die Bildung von Kleinkernen und Karyomeren (Tafel 8 (S. 27), Abb. e - g) wurde nach der Erholung von kurzzeitiger CdSO_4 -Exposition gehäuft beobachtet. Der Größe nach lassen sich die Kleinkerne entweder auf Chromosomenbruchstücke, auf einzelne Chromosomen oder auch auf kleinere Chromosomengruppen zurückführen. In vielen Kleinkernen sind kräftige Nukleolen zu sehen, die auf eine biosynthetische Aktivität hinweisen. Mitosen von Kleinkernen wurden allerdings nicht beobachtet.

3.3 WIRKUNG VON CdSO_4 AUF DIE CHROMOSOMENSTRUKTUR

3.3.1 CHROMOSOMENANALYSE NACH LANGZEITEXPOSITION

Zur Untersuchung der Wirkung von CdSO_4 auf die Chromosomenstruktur wurde zunächst eine sechzehnstündige Behandlung der Zellen mit Konzentrationen von 10^{-8} - 10^{-5} Mol/l durchgeführt. Die Präparate wurden nach Colcemidapplikation und hypotoner Behandlung angefertigt.

Im Vergleich zu den Kontrollen ergibt sich für Konzentrationen von 5×10^{-6} Mol CdSO_4 /l und geringer kein Anhaltspunkt für eine erhöhte Rate struktureller



Tafel 10: a - d Zellen mit gleichartigem Schädigungsgrad, die vermutlich jeweils in derselben generativen Phase mit CdSO_4 behandelt wurden. a und b: multiple strukturelle Chromosomenaberrationen, c aufgelockerte Struktur der Chromosomen, d Zusammenballung von Chromosomenmaterial.

Chromosomenaberrationen im Vergleich zu den Kontrollen (Tabelle 3). Unter den mit der Konzentration von 10^{-5} Mol CdSO_4 /l behandelten Zellen zeigten etliche Mitosefiguren strukturelle Chromosomenaberrationen. Eine Auswertung war jedoch nicht möglich, weil viele Chromosomen eine stark aufgelockerte Struktur hatten (Tafel 10 (S. 34), Abb. c) oder eine abnorme Spiralisierung zeigten (Tafel 2 (S. 15), Abb. a). Einige Mitosefiguren zeigten auch Pulverisierungseffekte (Tafel 2 (S. 15), Abb. b - e) oder zusammengeballtes Chromosomenmaterial (Tafel 2 (S. 15), Abb. f, Tafel 10 (S. 34), Abb. d). Außerdem war der Mitoseindex gegenüber den Kontrollen stark erniedrigt (Fig. 1).

Tabelle 3: Chromosomenanalyse von je 1000 Metaphasen (Metaphasen-Arretierung durch $0,2 \mu\text{g}$ Colcemid/ml 2 h vor Fixierung).

CdSO ₄ -Konzentration (Mol/l)	Ungestörte Metaphasen	Gaps	Strukturelle Chromosomenaberrat.	
			Dizentrische Chromosomen	Chromosomenringe
1×10^{-8}	989	10	1	-
1×10^{-7}	991	7	1	1
5×10^{-7}	992	8	-	-
1×10^{-6}	982	15	-	3
5×10^{-6}	993	5	2	-
Kontrolle	986	12	1	1

3.3.2 CHROMOSOMENANALYSE NACH KURZZEITIGER EXPOSITION MIT ANSCHLIESSENDER ERHOLUNG

Da die unmittelbare Fixierung der Zellen nach CdSO_4 -Langzeit-Exposition kein auswertbares positives Ergebnis in bezug auf Chromosomenaberrationen ergeben hatte, wurden modifizierte Versuche mit einer unterschiedlich langen Erholungszeit im Anschluß an die CdSO_4 -Exposition durchgeführt. Dabei wurden im Vergleich zu den Kontrollen teilweise stark erhöhte Raten struktureller Chromosomenaberrationen gefunden.

Tabelle 4: Chromosomenanalyse von jeweils 500 Zellen (Metaphasen-Arretierung durch 0,2 µg Colcemid/ml 2 h vor Fixierung), CdSO₄-Exposition 1h 10⁻⁴ Mol/l, Erholungszeit variabel. Die Angaben in der Tabelle bezeichnen die Aberrationshäufigkeit pro 500 Metaphasen, in der Klammer ist jeweils die Zahl der Zellen mit den entsprechenden Aberrationen angegeben. I und II sind zwei unter gleichen Bedingungen durchgeführte Versuche.

Erholungszeit (h)	Gaps	Iso-gaps	Chromatidbrüche	Chromatidinkomplett	Chromatidaustauschkomplett	Chromatidkomplex	Chromatidringe	Zellen mit strukturellen Chromosomendefekten
2	6 (6)	1 (1)	1 (1)	-	-	-	-	1
4	9 (9)	2 (2)	1 (1)	-	1 (1)	-	-	2
6	11 (9)	1 (1)	11 (3)	-	-	-	1 (1)	3
8	26 (19)	1 (1)	-	-	1 (1)	-	-	1
10	9 (9)	-	-	-	1 (1)	1 (1)	-	2
12	5 (5)	2 (2)	-	-	-	-	-	-
15	24 (19)	-	68 (26)	19 (16)	29 (24)	1 (1)	2 (2)	59
18	7 (4)	-	52 (21)	21 (19)	41 (33)	13 (10)	3 (3)	51
21	60 (36)	-	121 (53)	57 (45)	63 (48)	34 (26)	-	114
24	6 (6)	-	3 (2)	3 (3)	5 (4)	-	1 (1)	6
27	8 (7)	-	24 (11)	12 (9)	10 (7)	1 (1)	-	22
30	8 (4)	-	15 (3)	5 (5)	13 (8)	10 (9)	3 (3)	21
33	1 (1)	-	-	2 (1)	8 (7)	2 (2)	-	8
Kontrolle zu I	6 (6)	-	-	-	2 (1)	-	-	1
Kontrolle zu II	4 (4)	-	1 (1)	-	-	-	-	1

Tabelle 5: Chromosomenanalyse von jeweils 500 Zellen (Metaphasen-Arretierung durch 0,2 µg Colcemid/ml 2h vor

Fixierung), CdSO₄-Exposition 0,5h 10⁻⁴ Mol/l, Erholungszeit variabel. Die Angaben in der Tabelle bezeichnen die Aberrationshäufigkeit pro 500 Metaphasen, in der Klammer ist jeweils die Zahl der Zellen mit den entsprechenden Aberrationen angegeben.

Erholungszeit (h)	Gaps	Iso-gaps	Chromatid-brüche	Chromatidaustauschprozesse			Chromosomen-Ringe	Dizentr. Chromosomen	Zellen mit strukturellen Chromosomendefekten
				in-kom-plett	kom-plett	kom-plex			
15,5	10 (9)	-	9 (5)	1 (1)	2 (2)	1 (1)	-	1 (1)	8
18,5	13 (12)	1 (1)	-	2 (2)	4 (2)	2 (2)	-	-	6
21,5	6 (6)	1 (1)	-	2 (1)	1 (1)	-	1 (1)	1 (1)	4
Kontrolle	6 (6)	-	-	-	2 (1)	-	-	-	1

Tabelle 6: Chromosomenanalyse von jeweils 100 polyploiden Zellen (Metaphasen-Arretierung durch 0,2 µg Colcemid/ml 2h vor Fixierung), CdSO₄-Exposition 1h (10⁻⁴ mol/l), Erholungszeit variabel. Die Angaben in der Tabelle bezeichnen die Aberrationshäufigkeit pro 100 Metaphasen, in der Klammer ist die prozentuelle Häufigkeit der Zellen mit den entsprechenden Aberrationen angegeben.

Erholungszeit (h)	Gaps	Iso-gaps	Chromatid-brüche	Chromatidaustauschprozesse			Chromatid-ringe	Dizentr. Chromosomen	Zellen mit strukturellen Chromosomendefekten
				in-kom-plett	kom-plett	kom-plex			
24	1 (1)	-	-	-	2 (1)	-	-	-	1
27	1 (1)	-	10 (1)	2 (2)	1 (1)	-	1 (1)	-	2
30	2 (1)	-	-	-	-	-	1 (1)	1 (1)	2
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kontrolle	3 (3)	1 (1)	-	-	1 (1)	-	-	-	1

Auch die Rate der gaps (=achromatische Lucken) war gegenüber den Kontrollen häufig erhöht. Eine eindeutige Korrelation zum Anstieg struktureller Chromosomenaberrationen war jedoch nicht festzustellen (Tab. 4 und 5).

3.3.2.1 Variable Expositions- und Erholungszeit

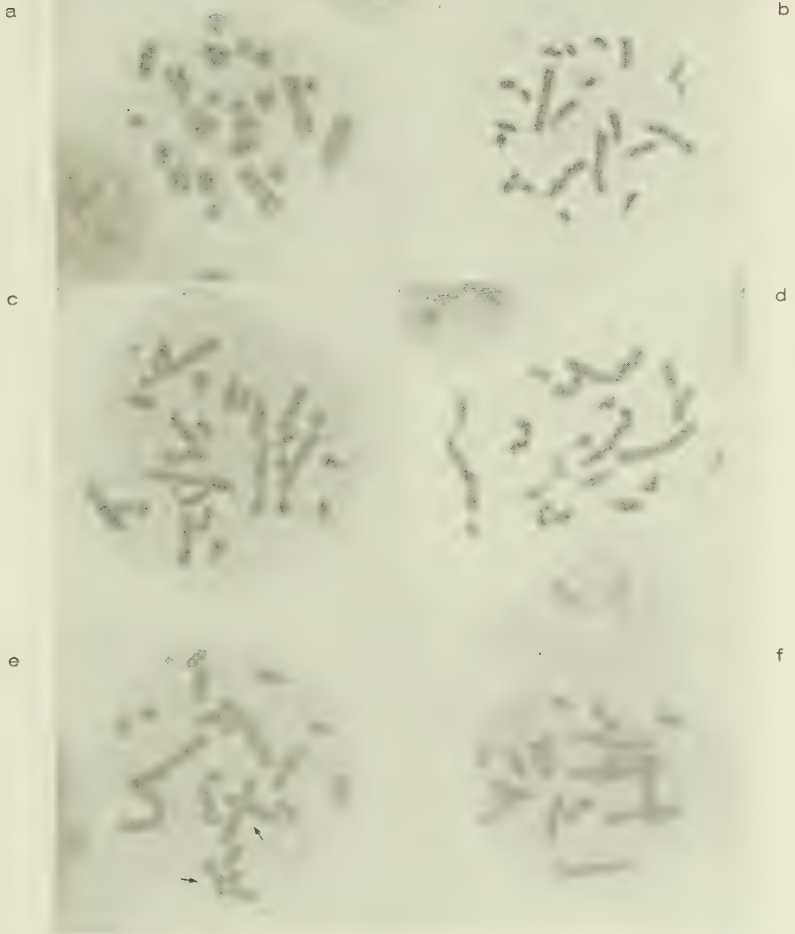
Zunächst wurde ein Versuch mit Expositionszeiten von 1/2, 1 und 2 h mit 10^{-4} molarer CdSO_4 -Lösung durchgeführt (Versuch I). Die Erholungszeiten betrugen 15 - 21,5 h. Die 0,5 h behandelten Zellen weisen nur einen geringen Anstieg der Rate struktureller Chromosomenaberrationen gegenüber den Kontrollen auf (Tab. 5). Dagegen ist die Rate der Metaphasen mit strukturellen Chromosomenaberrationen unter den einstündig exponierten Zellen relativ hoch und erreicht nach 21 h Erholung ca. 20 % der Metaphasen (Tab. 4, Versuch I). Die Expositionszeit von 2 h ergab keine auswertbaren Metaphasen (unter 3.1.4 beschrieben).

Die Einteilung der Aberrationstypen beruht auf der von BAUCHINGER (1972) angegebenen Systematik. In der Auswertung sind alle festgestellten Aberrationsfiguren berücksichtigt. Wenn bei einem Chromatid austausch mehr als zwei Chromosomen beteiligt waren, wurde die Austauschfigur als "komplex" bezeichnet. Beispiele für verschiedene Aberrationstypen sind auf den Tafeln 11 - 13 (S. 39 - 41) gegeben.

3.3.2.2 Variable Erholungszeit

Da die einstündige Expositionszeit mit 10^{-4} molarer CdSO_4 -Lösung eine erhöhte Rate struktureller Chromosomenaberrationen ergeben hatte, wurde in einem weiteren Versuch mit einer entsprechenden Exposition die Erholungszeit zwischen 2 und 12 h sowie 24 und 33 h variiert. Das Auswertungsergebnis einer Analyse von jeweils 500 Metaphasen zeigt Tab. 4 (Versuch II).

Aus dieser Tabelle geht hervor, daß in den ersten 12 h nach der CdSO_4 -Exposition gegenüber den Kontrollen keine erhöhten Aberrationsraten festzustellen sind. Nach 24 - 33 h Erholung liegen diese Raten jedoch deutlich über denen der Kontrollen.



Tafel 11: a - f strukturelle Chromosomenaberrationen. a einfacher Chromatidbruch, b zwei einfache Chromatidbrüche, c und d multiple Chromatidbrüche, e komplette symmetrische Chromatidaustauschfiguren (Pfeile), f multiple Chromatidaustauschfiguren und Fragmentation.



Tafel 12: a - f strukturelle Chromosomenaberrationen.

Beispiele für spezielle Chromatidaustauschtypen:

komplexe
asymmetrisch komplette
symmetrisch "
symmetrisch inkomplette

Austauschfiguren (↓) a, d, c, e
(↓c) b, c, d, f
(▼c) f
(▼ic) f



Tafel 13: a - f strukturelle Chromosomenaberrationen.

Beispiele für spezielle Austauschtypen (Pfeil):

a Ringchromosom, b inkompletter asymmetrischer Chromatidaustausch ($\blacktriangle$), c komplexer Chromatidaustausch ($\dagger$), d komplexer Chromatidaustausch mit Ringbildung, e komplexe Austauschfiguren mit Pulverisierung, f komplexe Austauschfiguren mit Fragmentation.

3.3.2.3 Chromosomenanalyse polyploider Metaphasen

Im zweiten Erholungsversuch konnte in einem Zeitraum zwischen 24 und 33 h ein starker Anstieg polyploider Metaphasen beobachtet werden (Fig. 7), der sicherlich als Folge der stathmokineticischen Aktivität des CdSO_4 anzusehen ist. Zellen mit im diploiden Bereich liegenden Chromosomensätzen wiesen zu diesem Zeitpunkt erhöhte Aberrationsraten auf. Durch eine Analyse von jeweils 100 polyploiden Metaphasen sollte geprüft werden, ob dies zu den entsprechenden Erholungszeiten auch für diesen Zelltyp zutrifft. Es zeigte sich jedoch, daß strukturelle Chromosomenaberrationen in polyploiden Zellen nicht vermehrt waren (Tab. 6, S. 36).

3.4 MODIFIZIERENDE FAKTOREN DER ABERRATIONS-AUSBEUTE

Als modifizierende Faktoren für die Aberrationsausbeute sind schon CdSO_4 -Konzentrationen und Expositionszeit sowie Erholungszeit in den entsprechenden Abschnitten behandelt worden. Darüber hinaus wurden zwei weitere modifizierende Faktoren ermittelt:

3.4.1 MEDIUM WÄHREND DER EXPOSITION

Da Cd^{2+} mit zahlreichen Bestandteilen des Vollmediums Ionenbindungen eingehen kann (52), bestand der Verdacht, daß eine quantitative Veränderung der Zusammensetzung des Mediums die effektive Wirksamkeit des Agens verändern kann. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde in einem Versuch einmal die CdSO_4 -Lösung den Zellen in den Petrischalen im alten, an Nährstoffen verarmten Medium zugesetzt und in der zweiten Petrischale wurde das alte Medium zunächst gegen frisches Vollmedium ausgetauscht und anschließend die CdSO_4 -Lösung zugesetzt. Die CdSO_4 -Konzentration betrug in beiden Petrischalen 10^{-4} Mol/l. Nach einer Expositionszeit von 1 h konnten sich die Zellen 21 h in frischem Vollmedium erholen.

Die Auswertung von jeweils 500 Metaphasen bestätigt die oben dargelegte Vermutung: Der Zusatz von frischem Vollmedium während der Exposition ver-

Tabelle 7: Chromosomenanalyse von jeweils 500 Zellen (Metaphasen-Arretierung durch 0,2 µg Colcemid/ml 2 h vor Fixierung). Konstante Bedingungen: 1 h CdSO₄-Exposition, anschließend 21 h Erholung, variable Bedingungen: Medium während der Exposition und CdSO₄-Konzentration. Die Angaben in der Tabelle bezeichnen die Aberrationshäufigkeit pro 500 Metaphasen, in der Klammer ist jeweils die Zahl der Zellen mit den entsprechenden Aberrationen angegeben.

Medium während der Exposition (Mol CdSO ₄ /l)	Gaps	Chromatidbrüche	Chromatid austauschprozesse			Ringe		Zellen mit strukturellen Chromosomendefekten
			inkomplett	komplett	komplex	Chromatid	Chromosomen	
frisches Medium (10 ⁻⁴)	2 (2)	3 (2)	1 (1)	2 (2)	-	-	-	5
altes Medium belassen (10 ⁻⁴)	8 (7)	115(43)	34(29)	27(22)	20(16)	5 (5)	1 (1)	73
altes Medium belassen (1,5x10 ⁻⁴)	10 (8)	193(68)	61(48)	48(41)	11(11)	5 (5)	3 (3)	117

Tabelle 8: Chromosomenanalyse von jeweils 100 Metaphasen, die entsprechend ihrer Position zu umliegenden Zellen zwei Kategorien zugeordnet wurden. Nähere Erläuterung im Text. Die Angaben in der Tabelle bezeichnen die Aberrationshäufigkeit pro 100 Metaphasen, in der Klammer ist jeweils die Zahl der Zellen mit den entsprechenden Aberrationen angegeben.

Kategorie	Gaps	Iso-gaps	Chromatidbrüche	Chromatid austausch			Ringe		Zellen mit strukturellen Chromosomendefekten
				inkomplett	komplett	komplex	Chromatid	Chromosomen	
A	18(16)	2(2)	146(46)	38(26)	22(15)	22(14)	9(7)	-	59
B	8 (5)	-	18 (8)	16(11)	7 (6)	10 (6)	1 (1)	-	22

mindert die Auslösung von Chromosomenaberrationen gegenüber dem Belassen des alten Mediums um mehr als den Faktor 14 (Tab. 7).

3.4.2 ZELLDICHTE

Eine spezielle Auswertung wurde vorgenommen, nachdem auf einem Präparat (Erholungsversuch I, 1 h CdSO_4 -Exposition mit 21 h Erholung), welches auf einer Seite einen dürrftigen Zellbewuchs aufwies, eine überdurchschnittliche Chromosomenaberrationsrate beobachtet worden war. Um diese Beobachtung quantitativ zu erfassen, wurde eine Chromosomenanalyse durchgeführt und dabei zwei Kategorien von Zellen unterschieden.

In der Kategorie A wurden Zellen erfaßt, die mindestens auf drei Seiten einen minimalen Freiraum ihres Zelldurchmessers hatten. Die Bedingung für eine Zuordnung zur Kategorie B war, daß die zu analysierende Zelle allseitig von anderen Zellen umgeben war. Alle Metaphasen, die sich nicht in eine dieser beiden Gruppen einordnen ließen, wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Das Ergebnis der Auswertung von jeweils 100 Metaphasen zeigt Tab. 8: In den Zellen der Kategorie A wurden mehr Chromosomenaberrationen gefunden. Dieses Ergebnis stimmt gut mit der unter 3.1.1 dargelegten unterschiedlich starken Schädigung von Zellen am Rande und innerhalb von Kolonien überein.

4. DISKUSSION

Bei der Einwirkung von Cadmium auf die Fibroblasten einer etablierten Zell-Linie des Chinesischen Hamsters lassen sich cytologische und cyto-genetische Effekte feststellen.

4.1 CYTOLOGISCHE EFFEKTE

Ein wesentlicher cytologischer Effekt von Cadmium ist die Zell-Prolifera-tionshemmung. Unter 3.1.1 wurde dargelegt, wie der stathmokinetiche Mitoseindex nach Langzeitexposition mit steigender CdSO_4 -Konzentration abnimmt (Fig. 1).

Als Erklärung für die Hemmung der mitotischen Aktivität bietet sich ein-mal die von VALLEE et al. (1972) nachgewiesene Hemmung der oxydativen Phosphorylierung durch Cd an. Diese Hemmung vermindert nach EPEL (1963) die mitotische Aktivität. VALLEE et al. stellten außerdem eine unterschied-liche Beeinflussung der Aktivität von Enzymen durch Cd fest (teilweise hemmend, teilweise verstärkend). Auch dadurch könnte der geregelte Ablauf von physiologischen und biochemischen Prozessen in der Zelle gestört wer-den, was sich negativ auf die mitotische Aktivität auswirken kann.

Bei maximaler Hemmung erlischt die mitotische Aktivität vollkommen. In einem Versuch mit Langzeitexposition trat dies nach sechzehnständiger 10^{-5} molarer CdSO_4 -Behandlung ein. Im zweiten Versuch mit Langzeitexposition führte eine CdSO_4 -Behandlung von 9×10^{-6} Mol/l über 48 h nur in kleineren Kolonien zu einem völligen Sistieren der mitotischen Aktivität, innerhalb größerer Kolonien waren hingegen noch einige normale Mitosephasen zu beobachten.

Die unterschiedliche Koloniengröße ist vermutlich auf Loslösung einzelner Zellen von den Kolonien und Gründung neuer Kolonien zurückzuführen. Diese Kolonien erreichen aufgrund ihres späteren Entstehens eine geringere Größe als die schon bestehenden.

Möglicherweise hat die tagliche Begasung des Schliffglases, in dem sich die Petrischalen befanden, eine Loslösung von einzelnen Zellen verursacht. Ebenso kann auch ein Proliferationsdefekt einzelner Zellen für das Entstehen kleinerer Kolonien verantwortlich sein. - Bei Hinzufügung von CdSO_4 -Lösung drei Tage nach Zelleinsaat bestanden somit unterschiedlich große Kolonien, von denen die kleineren stärker als die größeren geschädigt wurden (Abb. 1, S. 14).

Die unterschiedlich starke Hemmung der mitotischen Aktivität weist darauf hin, daß dichte Zellrasen unempfindlicher gegen CdSO_4 sind als Einzelzellen. Darauf deutet auch die unter 3.4.2 dargestellte Auswertung hin, bei der von anderen Zellen umgebene Zellen weniger strukturelle Chromosomenaberrationen aufwiesen als freiliegende.

Eine Ursache für die geringere Wirkung von Cd auf Zellen in großen Kolonien als auf Zellen in kleineren Zellgruppen bzw. Einzelzellen könnte eine unterschiedlich große, dem Medium zugewandte, Zelloberfläche sein. Wenn eine Zelle allseitig dicht von anderen Zellen umgeben ist, so ist ihre freie, dem Medium zugewandte Oberfläche kleiner als diejenige freiliegender Zellen. Sie nimmt daher pro Zeiteinheit weniger Cd auf als eine Zelle, die an einer oder mehreren Seiten keinen Kontakt mit anderen Zellen hat.

Eine weitere mögliche Ursache der unterschiedlichen Wirkung von Cd auf verschiedene Kolonien wäre eine unterschiedliche Empfindlichkeit verschiedener Zellen gegenüber Cd. Die von sehr empfindlichen Zellen abstammenden Kolonien würden dann stärker geschädigt als die von weniger empfindlichen Zellen abstammenden. Damit ließe sich das Entstehen sehr unterschiedlich großer Kolonien durch Selektion erklären.

Bei gleicher CdSO_4 -Konzentration kann eine unterschiedliche quantitative Zusammensetzung des Mediums Wirkungsdifferenzen auf die Zellen ergeben. Unter 3.4.1 ist ein Versuchsergebnis dargestellt, in dem die CdSO_4 -Exposi-

tion in frischem Vollmedium eine um den Faktor 14 verminderte Rate an strukturellen Chromosomenaberrationen gegenüber der gleichartigen Exposition in altem Medium ergab.

Als Ausgangspunkt für eine Suche nach der Ursache dieser unterschiedlichen Wirkung bietet sich die Protein-Konzentration während der CdSO_4 -Exposition an. Da die Zellen durch Pinocytose auch Protein aufnehmen (27), wird dessen Konzentration im Medium mit der Wachstumszeit der Zellen vermindert. Nach einer Zellwachstumszeit von 40 h kann eine erhebliche Verminderung der Protein-Konzentration im Medium angenommen werden.

Cd bildet mit den Sulfhydryl-, Imidazol- und anderen Gruppen der Proteine, Aminosäuren etc. komplexe Verbindungen (52). Unter den Eiweißen nimmt das Thionein eine Sonderstellung ein. Es ist ein Protein mit 20 SH-Gruppen, von denen jeweils 3 einen Ort für eine relativ stabile Metallbindung darstellen (27, 52). Es vermag ca. 6 % Cd zu binden (52).

Die unterschiedliche Stabilität der Cd-Substrat-Komplexe bewirkt verschiedene Bindungsverhältnisse bei unterschiedlicher quantitativer Zusammensetzung des Mediums. Ein hoher Protein-Anteil bindet viel Cd, das während der Expositionszeit vermutlich nur zu einem geringen Teil durch Pinocytose resorbiert wird. Wenn die Protein-Konzentration hingegen gering ist, bildet Cd mit den anderen Substraten, z. B. Aminosäuren, komplexe Verbindungen. Die unter 3.4.1 dargelegten Auswertungsergebnisse sind auf diese Weise unter der Voraussetzung erklärbar, daß die Cd-Substrat-Komplexe, bei denen das Substrat kein Protein ist, besser resorbiert werden als die Cd-Protein-Komplexe.

Ein weiterer bemerkenswerter Effekt von Cd sind die unter 3.1.2 und 3.1.3 beschriebenen zellkernmorphologischen Befunde. Eine einstündige CdSO_4 -Exposition ergibt nach 21 h Erholung eine konzentrationsabhängige Zunahme an stark deformierten Zellkernen (Tab. 1). Diese Zunahme erfolgt jedoch nicht kontinuierlich mit zunehmender CdSO_4 -Konzentration, sondern stufen-

förmig (Fig. 2). Eine Erklärung dieses Phänomens wäre eine unterschiedliche Empfindlichkeit der Zellen in den einzelnen Interphase-Stadien. - Für einen Beweis dieser Hypothese waren jedoch Experimente mit synchronisierten Zellen erforderlich.

Die vergleichende Untersuchung von Colcemid und CdSO_4 (3.2.2) erbrachte nur nach CdSO_4 -Exposition eine Zunahme der stark deformierten Zellkerne mit zunehmender Expositionszeit. Nach Colcemid-Exposition wurden keine Zellkernveränderungen beobachtet. In dem angeführten Versuch waren die Zellen nicht mit einer hypotonen Lösung behandelt worden, so daß die Zellkerndeformierungen nicht einfach mit einem Verlust der osmotischen Resistenz zu erklären sind. Auch die lichtmikroskopisch intakt erscheinenden Zellkernbegrenzungen liefern dafür keinen Anhaltspunkt.

Beim Vergleich der normalen Zellkerne (Tafel 4 (S. 19), Abb. a) mit den stark deformierten Zellkernen (Tafel 4 (S. 19), Abb. b, c, Tafel 1 (S. 13), Abb. a - c, Tafel 5 (S. 21), Abb. a - c) entsteht eher der Verdacht, daß durch Cd die statische Struktur des Zellkerns wesentlich geschädigt wird. Nach einer derartigen Schädigung der statischen Struktur konnte eine Druckdifferenz zwischen Kerninnerem und Kernäußerem zu einer Segmentierung des Kerns (Tafel 1 (S. 13), Abb. a - c) führen. Eine stärkere Schädigung der statischen Struktur könnte dann bei entsprechenden Druckgradienten zu einer schlauchförmigen Deformierung des Kerns führen (Tafel 4 (S. 19), Abb. b, c, Tafel 5 (S. 21), Abb. a - c).

Das morphologische Substrat dieser statischen Struktur ist lichtmikroskopisch nicht erkennbar. JAFFRAY et al. (1974) beobachteten elektronenmikroskopisch interchromosomale Filamente, die nach SCHNEIDER (1973) aus DNS und Proteinen bestehen sollen. Ob diesen Filamenten auch eine strukturerhaltene statische Funktion zukommt, ist nicht bekannt. Falls dies zuträfe, wäre die Zerstörung der statischen Struktur durch Cd leicht erklärbar, denn wenn die interchromosomalen Filamente aus dem gleichen Material wie die Chromosomen bestehen würden, so könnten in ihnen durch Einwirkung von Cd Diskontinuitäten auf die gleiche Weise entstehen wie bei Chromosomenbrüchen.

4.2 WIRKUNG AUF DEN MITOTISCHEN BEWEGUNGSAPPARAT

Als weiterer Effekt von Cd ist eine stathmokinetiche Wirkung festzustellen, die als Anreicherung der Mitosen in der Metaphase (C-Metaphasen) erfaßbar ist. Unter 3.2.1 ist ein Versuch beschrieben, in dem ab CdSO_4 -Konzentrationen von 5×10^{-6} Mol/l eine Metaphase-Anreicherung erzielt wurde. Dadurch ergab sich jedoch noch kein signifikanter Anstieg des Mitoseindex gegenüber den Kontrollen, weil dem Anstieg des Metaphasen-Index ein Abfall des Prophasen-Index sowie des Ana- und Telophasen-Index gegenüberstand.

Ein signifikanter Anstieg des Mitoseindex war erst ab Konzentrationen von 10^{-5} Mol CdSO_4 /l zu beobachten. Die dadurch angereicherten Metaphasen gleichen überwiegend den von LEVAN (1954) beschriebenen Ballmetaphasen (alle Chromosomen ungeordnet in einem Zentrum zusammengepackt) und Mehrgruppenmetaphasen (mehrere Gruppen zusammengepackter Chromosomen) (Tafel 8 (S. 27), Abb. a), die der Autor als "initiale" C-Mitosen charakterisiert. Metaphasen mit über die ganze Zelle verteilten Chromosomen, wie sie nach optimal wirkenden Colcemid-Konzentrationen erzielt werden (Tafel 7 (S. 25), Abb. b, c), wurden erst bei der höchsten getesteten Konzentration von 10^{-4} Mol CdSO_4 /l erreicht.

Die Applikation von stathmokinetiche optimal wirkenden Dosen Colcemid führt normalerweise bis zu einer Expositionszeit von 8 h zu einem annähernd proportional der Expositionszeit ansteigenden stathmokinetiche Mitoseindex (49) (Fig. 4). Das ist auf die Zerstörung des mitotischen Apparates durch Colcemid zurückzuführen, welches mit einem Hauptbestandteil (Protein) des mitotischen Apparates eine reversible Bindung eingeht (6). Das Resultat ist eine apolare Stathmokinese und führt zu einer Anreicherung der Mitosefiguren in der Metaphase, während Ana- und Telophasen nicht mehr nachweisbar sind. Der Eintritt der Zellen in die Mitose wird durch Colcemid in den üblichen Konzentrationen (bis 0,2 µg/ml) nicht gehemmt.

Nach Langzeit-Colcemid-Exposition wurde allerdings auch eine Hemmung der mitotischen Aktivität festgestellt. STUBBLEFIELD (1964) beobachtete nach einer derartigen Exposition bei Zellen des Chinesischen Hamsters in den ersten 6 - 7 h einen proportional der Expositionszeit ansteigenden stathmokinethischen Mitoseindex, anschließend erfolgte ein langsamerer Anstieg. Der Autor vermutet eine reversible Hemmung durch Colcemid im frühen Stadium der DNS-Synthese.

Durch CdSO_4 -Exposition läßt sich aber schon nach 2 h eine signifikante Mitosehemmung nachweisen, die nach 4 h Exposition absolut wird (keine Prophasen mehr nachweisbar, 3.2.2). Da die G_2 -Phase bei den Fibroblasten des Chinesischen Hamsters ca. 2,5 h dauert (18, 50), erfolgt die Mitosehemmung offensichtlich nach der S-Phase. Unter 4.1 ist eine mögliche Erklärung für diese Hemmung dargelegt worden.

Stathmokinese und Mitosehemmung haben auf die Mitoseanreicherung einen entgegengesetzten Einfluß, so daß auch bei maximaler Metaphasen-anreicherung durch Cd ein geringerer stathmokinethischer Mitoseindex als durch Colcemid erzielt wird. Die durch Cd induzierte Stathmokinese ist vermutlich auf komplexe Bindungen der Grundsustanz der Spindel mit Cd zurückzuführen, wie sie vom Colcemid gesichert sind (6, 43). Der mitotische Apparat ist aus verschiedenen Proteinen aufgebaut, deren Hauptbestandteil (2,5 S-Protein) über 7 SH-Gruppen verfügt (24, 37). Bei der bekannten Affinität der SH-Gruppen zu Cadmium (52) ist eine Interaktion des Cd mit dem mitotischen Apparat auf diesem Wege gut möglich.

Die durch Cd verursachte Stathmokinese ist einmal mit der Metaphasen-anreicherung, zum anderen mit dem Anstieg des Polyploidieindex nach Erholung von einstündiger CdSO_4 -Exposition (3.2.3.3) zu belegen. Dieser Index erreicht nach 30 h Erholung die mehr als dreifache Höhe der Kontrollen. Ein Anstieg der Rate polyploider Zellen ist nach LEVAN (1954) eine Folge der stathmokinethischen Wirkung. Auch STUBBLEFIELD (1964) stellte nach Colcemid-Exposition einen erhöhten Anteil polyploider Zellen fest.

Der Polyploidieindex liegt jedoch schon nach 2 - 6 h Erholung von einstündiger CdSO_4 -Exposition signifikant über den Kontrollwerten. Dieser Anstieg kann nicht auf Stathmokinase zurückgeführt werden. Er könnte so interpretiert werden, daß polyploide Zellen aufgrund des kleineren Verhältnisses von Zelloberfläche zu Zellvolumen in Relation zur Cd-Bindungskapazität weniger Cd als Zellen mit Chromosomenzahlen im diploiden Bereich aufnehmen. Ihre mitotische Aktivität wird infolgedessen geringer gehemmt.

Ein Anstieg des Polyploidieindex infolge Stathmokinase ist erst einen Zellzyklus nach Applikation des stathmokinischen Agens zu erwarten, der bei den Fibroblasten des Chinesischen Hamsters 12 - 14 h dauert (18, 50). Infolge Hemmung der mitotischen Aktivität durch Cd (Fig. 6) dauerte der Zellzyklus wahrscheinlich noch länger. Der starke Anstieg des Polyploidieindex von 24 bis 33 h ist wahrscheinlich eine Folge der Stathmokinase (Fig. 7).

Die insbesondere nach längerer Erholung beobachteten Kleinkerne (3.2.3.5) dürften zum Großteil auch der stathmokinischen Wirkung von Cd zuzuschreiben sein. Auch STUBBLEFIELD (1964) beobachtete nach Langzeit-Colcemid-Exposition das Entstehen von Zellen mit Kleinkernen. LEVAN (1954) registrierte während der Erholung von Colcemid-Behandlung ebenfalls mehrkernige Zellen. Er sah jedoch selten mehrkernige Prophasen und nahm daher an, daß die Karyomeren und Kleinkerne zum großen Teil vor der Mitose fusionieren. - In den besprochenen Erholungsversuchen wurden keine Prophasen von Zellen mit Karyomeren und Kleinkernen gefunden. Bei der geringen Rate dieser Zellen kann daraus jedoch kein Schluß gezogen werden.

4.3 WIRKUNG AUF DIE CHROMOSOMENSTRUKTUR

Die Induktion von Chromosomenaberrationen durch Cd gelang in mehreren voneinander unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikant hohe Aberrationsausbeuten im Vergleich zu den Kontrollen wurden aber nur nach Erholungszeiten von mehr als 13 h im Anschluß an eine einstündige CdSO_4 -Exposition erzielt.

Die mitotische Aktivität der Zellen war insbesondere unmittelbar nach der Exposition stark gehemmt (Fig. 6). Der Zellzyklus wurde dadurch gegenüber der normalen Dauer von 12 - 14 h wesentlich verlängert. Auf eine bestimmte Verlängerung einzelner Phasen des Zellzyklus kann durch die betreffenden Versuche nicht geschlossen werden. Dazu waren Versuche mit synchronisierten Zellen erforderlich. Es kann jedoch gesagt werden, daß die G_2 -Phase stark verlängert sein muß, da aus ihr die ersten Mitosen nach der Agens-Exposition hervorgehen.

Normalerweise dauert die G_2 -Phase bei den Fibroblasten des Chinesischen Hamsters ca. 2,5 h (18, 50). Infolge der starken Hemmung der mitotischen Aktivität durch Cd dürfte sie in den entsprechenden Versuchen (Tab. 4 und 5) aber ca. 3 - 5 mal so lange gedauert haben. Die lange Latenzzeit bis zum Auftreten von Chromosomendefekten nach akuter CdSO_4 -Exposition weist darauf hin, daß die Induktion von Chromosomenaberrationen durch Cd gar nicht oder nur zu einem geringen Grade während der prämitotischen G_2 -Phase stattfindet. Der geringe Anteil der Aberrationen vom Chromosomentyp nach allen beobachteten Erholungszeiten macht ferner eine starke Schädigung der Chromosomen während der G_1 -Phase unwahrscheinlich (1). Die Chromatidbrüche und -austauschprozesse ereignen sich demzufolge überwiegend oder gar ausschließlich in den Zellen, die während der S-Phase mit CdSO_4 behandelt wurden.

Dies läßt sich mit dem zeitlichen Auftreten der Häufung struktureller Chromosomenaberrationen gut vereinbaren: Die größte Rate an strukturellen Chromosomenaberrationen ergab sich nach 13 - 21 h Erholung. Die S-Phase dauert bei diesen Zellen normalerweise ca. 6 h (18, 50). Wenn die Zellen während

der S-Phase dem Agens exponiert werden, so treten sie (ohne Mitosehemmung) ca. 2,5 - 8,5 h später in die Mitose ein. Durch die starke Hemmung der mitotischen Aktivität durch Cd (Fig. 6) ist eine Verschiebung bis auf 21 h durchaus erklärlich.

Obwohl in den Versuchen keine synchronisierten Zellen benutzt wurden, kann durch die oben angestellten Überlegungen die Induktion der beobachteten Aberrationen in der S-Phase angenommen werden. Dabei scheint die frühe S-Phase wesentlich empfindlicher zu sein als die späte. Darauf weist die starke Zunahme der Aberrationsrate mit der Zunahme der Erholungszeit von 15 auf 21 h hin (Tab. 4).

Der große quantitative Unterschied in der Aberrationsausbeute zwischen den halbstündig und einstündig exponierten Zellen (Tab. 4 I und Tab. 5) läßt vermuten, daß die Chromosomenschädigung erst nach einer Schwellenkonzentration des Agens in der Zelle eintritt. Dies könnte auch eine Erklärung für das Wirksamwerden eines unter 3.4.2 dargestellten modifizierenden Faktors der Aberrationsausbeute sein. Die stark unterschiedliche Schädigung der Zellen in Abhängigkeit von ihrer Position zu anderen Zellen könnte bedeuten, daß für jede Zelle eine spezifische quantitative Cd-Aufnahme anzunehmen ist. Demzufolge erreichen nicht alle Zellen gleichzeitig die Cd-Schwellenkonzentration, die für die Induktion von Chromosomenaberrationen erforderlich ist bzw. einige Zellen erreichen diese Konzentration überhaupt nicht oder aber überschreiten die letale Konzentration.

Wenn die oben aufgestellte Hypothese zutrifft, nach der eine Induzierbarkeit von Chromosomenaberrationen durch Cd ausschließlich oder überwiegend in der S-Phase möglich ist, so ist eine Interpretation der unter 3.2.1 und 3.3.1 dargelegten, in bezug auf die Induktion von Chromosomenaberrationen negativen Versuchsergebnisses möglich.

In einem Versuch (Tab. 2) waren die Zellen unmittelbar nach drei stündiger CdSO_4 -Exposition fixiert worden. Die G_2 -Phase von Fibroblasten des Chinesischen Hamsters dauert zwar nur ca. 2,5 h, das Cd verursacht aber in höheren Dosen auch eine starke Mitosehemmung (3.2.1). Darum erreichen Zellen, die sich während der Agens-Exposition in der Synthesephase befanden und die Schwellenkonzentration erreichten, die Mitose nicht mehr.

Das in bezug auf die Induktion von Chromosomenaberrationen ebenfalls negative Ergebnis einer 16-stündigen CdSO_4 -Exposition (Tab. 3) kann ähnlich gedeutet werden. Bei geringen CdSO_4 -Konzentrationen dauert es sehr lange, bis die Cd-Schwellenkonzentration erreicht wird bzw. sie wird überhaupt nicht erreicht, so daß die Zeit bis zur Fixierung, zur Manifestation der Aberration nicht ausreichte. Bei der Behandlung mit höheren Konzentrationen wurde die Schwellenkonzentration für die Induktion von Aberrationen schneller erreicht, durch weitere zelluläre Aufnahme von Cd wurden die Zellen dann aber letal geschädigt (bei CdSO_4 -Konzentrationen von 10^{-5} Mol/l). In verschiedenen Zellen wurden zwar strukturelle Chromosomenaberrationen gefunden, die allerdings wegen der oft diffusen Schädigung (teilweise mit Pulverisierung der Chromosomen) nicht ausgewertet werden konnten (Tafel 2 (S. 15), Abb. a - e, Tafel 10 (S. 34), Abb. c, d).

Die beobachteten Pulverisierungen haben offensichtlich eine andere Ursache als die von SANDBERG et al. (1970) sowie IKEUCHI et al. (1971) beschriebenen. Die genannten Autoren gelangten durch ihre Arbeiten zu einer Hypothese, wonach Metaphasen einen (in der späten G_2 -Phase synthetisierten) Pulverisierungsfaktor besitzen sollen, der bei einer Fusion von Metaphase- und Interphasezelle eine Pulverisierung im Interphasekern induziert. Die Pulverisierung gelingt jedoch nicht, wenn der Interphasekern, der über einen membranbildenden Faktor verfügt, eine Membran um die Metaphase induzieren kann. Vielmehr entsteht dann ein "telophaseartiger" Kern.

Bei den im hier beschriebenen Versuch beobachteten Effekten handelt es sich um partielle oder totale Pulverisierungen, bei denen keine Hinweise auf vorausgehende Zell-Fusionen existieren (weder Metaphasechromosomen gemeinsam mit pulverisiertem Material in einer Zelle noch "telophaseartiger" Kern). Die Pulverisierungseffekte sind wahrscheinlich eine Steigerungsform von strukturellen Chromosomenaberrationen, also extreme Fragmentierung, die auch KATO (1968) bei Hamsterzellen nach Dimethylbenzanthrazen-Exposition im Erholungsversuch feststellte.

Nach 0,5 - 8-stündiger 10^{-4} molarer CdSO_4 -Exposition (3.1.2) mit unmittelbar anschließender Fixierung konnten hingegen keine Pulverisierungseffekte beobachtet werden. Die Chromosomen in den Mitosen waren vielmehr miteinander verklumpt (Tafel 3 (S. 17), Abb. b, c). Mit zunehmender Expositionszeit verminderte sich der Mitoseindex. Dafür konnten mehr hyperchromatische Kerne, Karyomeren und Kleinkerne beobachtet werden. Der Übergang von verklumpten Chromosomen in diese hyperchromatischen Gebilde ist daher anzunehmen.

Nach einer 21-stündigen Erholung im Anschluß an die CdSO_4 -Exposition (3.1.3) konnten keine erhöhten Raten hyperchromatischer Kerne festgestellt werden (Tab. 1). Kleinkerne traten in so geringer Anzahl auf, daß deren Erfassung nicht sinnvoll schien. Dagegen waren jetzt vermehrt pulverisierte Mitosen zu beobachten (Abb. b - e, S. 15), deren Rate mit steigender CdSO_4 -Konzentration zunahm.

Diese Beobachtungen weisen darauf hin, daß Cd in hoher Konzentration zu einer Verklumpung des Chromosomenmaterials führt. Durch eine anschließende Zugabe von frischem Medium kann diese Verklumpung aufgelockert werden, doch eine Erholung der Zellen ist nicht möglich, weil die Zellstruktur irreversibel geschädigt ist. Bei stärkerer Schädigung kann eine Kernmembran oft nicht mehr synthetisiert werden (Tafel 2 (S. 15), Abb. f).

4.4 CADMIUM ALS UMWELTNOXE

Die vorliegende Arbeit zeigt, daß durch Cd, dessen toxische Eigenschaften bekannt sind, sowohl cytologische als auch cytogenetische Effekte in Säugetierzellen induziert werden können. Damit ergibt sich die Forderung, die Umweltbelastung durch dieses Schwermetall möglichst gering zu halten. Dies gilt um so mehr, als Cd in lebenswichtigen und reproduktiven Organen des Menschen gespeichert wird und zudem sehr hohe Halbwertszeiten für die Ausscheidung dieses Metalls existieren.

Eine Übertragung der an Hamsterzell-Fibroblasten beobachteten Effekte von Cd auf andere Zellarten und -systeme - insbesondere des Menschen - ist sicher nur begrenzt möglich. Viele ähnlich gebaute Strukturelemente der Säugetierzellen lassen jedoch einen ähnlichen Wirkungsmechanismus vermuten.

4.4.1 SCHÄDEN DURCH CADMIUM - INTOXIKATION

Die beobachteten cytologischen Effekte nach CdSO_4 -Exposition bei Hamsterzellen können hypothetisch die Konstruktion einer Beziehung zur Entwicklung klinischer Krankheitsbilder infolge Cd-Intoxikation gestatten. Im Ergebnisteil sind mehrere cytoletale Effekte dargestellt. Die zellkernmorphologischen Veränderungen mit Segmentierung und schlauchförmiger Deformierung von Zellkernen sind mit Sicherheit letal. Statistokinetische Effekte, die zu Verteilungsstörungen der Chromosomen mit Bildung von aneuploiden Zellen führen, haben unbalancierte Genverhältnisse in den Tochterzellen zur Folge, die überwiegend letal sein dürften. Weiterhin führen strukturelle Chromosomenaberrationen mit Verlust genetischer Substanz häufig zum Zelluntergang. Die durch Chromosomen-Umbauprozesse erzeugten Defekte, wie dizentrische Chromosomen, asymmetrische oder komplexe Chromatidaustauschprozesse verhindern darüber hinaus geregelte Mitoseabläufe.

Die Fähigkeit des Cd zur Zerstörung von Mikrotubuli könnte auch neurotoxische Effekte verursachen. Die Neurotoxizität von Colcemid wird mit

seiner Wirkung auf das Tubulussystem der Neurone begründet (5, 10).- Nach akuter oraler bzw. pulmonaler Cd-Aufnahme werden starke Reaktionen des vegetativen Nervensystems beobachtet (8, 51). Ob Cd mit den Rezeptoren der Nerven reagiert oder neurotoxisch wirkt, ist nicht bekannt.

Lebensbedrohend ist oft die Entwicklung einer Bronchopneumonie, die noch 10 - 12 h nach akuter pulmonaler Cd-Aufnahme eintreten kann (8). Diese Entwicklung ließe sich mit der unter 4.1 erörterten strukturellen Schädigung des Zellkerns gut in Verbindung bringen. Die ständigen Druckschwankungen in der Lunge können von den strukturell geschädigten Zellen des Alveolarepithels nicht mehr toleriert werden, die Folge ist eine funktionelle Insuffizienz mit Ödembildung und Pneumonie.

Die Symptome der chronischen Cd-Aufnahme sind größtenteils durch die Cd-Anreicherung in den Organen bedingt. Der dadurch verursachten Zellnekrose folgt dann die Narbenbildung in Leber, Lunge (Emphysem) etc. Die Niere reagiert mit Glukos- und Proteinurie. Eine Störung der Kalzium-Phosphor-Bilanz ist ebenfalls eine Folge der Nierenschädigung, sie führt oft zur Osteoporose (8, 30). - In Japan kam es in der Umgebung einer Zinkhütte durch cadmiumhaltige Abwässer zu einer epidemisch auftretenden Krankheit mit Proteinurie und Osteoporose ("Itai-Itai"), die auf chronische Cd-Intoxikation zurückgeführt wurde. Bemerkenswert ist hierzu, daß SHIRAISHI (1975) in einer neueren Untersuchung bei 12 Patienten im Vergleich zu Kontrollen sowohl erhöhte Chromatidaberrationsraten als auch Aneuploidieraten in peripheren Lymphocyten feststellen konnte.

4.4.2 MÖGLICHE GENETISCHE SCHÄDEN DURCH CADMIUM

Die Möglichkeit einer mutagenen Schädigung der genetischen Substanz ist aufgrund der beobachteten Induktion von Chromosomenaberrationen durch Cd groß. In den Tabellen 4 und 5 sind die aufgetretenen Aberrationstypen aufgeführt. Die Mannigfaltigkeit der beobachteten Aberrationen ermöglicht alle erdenklichen Umbauprozesse, die mit Verminderung, Vermehrung oder Umlagerung der genetischen Substanz einhergehen. Multiple Aberrationen führen wahrscheinlich zum Zelluntergang. Einfache Austauschprozesse oder krypto-strukturelle Veränderungen der genetischen Substanz können aber über fortgesetzte Zellteilungen weitergegeben werden. Solche Mutationen könnten für Veränderungen der Erbsubstanz verantwortlich sein, die z. B. Enzymopathien, Speicherkrankheiten etc. bewirken. Außerdem besteht nach SCHMAHL (1970) zwischen cancerogener und mutagener Wirkung eines Agens eine relativ gute Übereinstimmung.

Die Spindelgift-Wirkung von Cd könnte auch Chromosomenfehlverteilungen induzieren. - Die bekannten Formen der D-, E- und G-Trisomien, deren Auftreten mit dem Alter der Mutter eine stark zunehmende Tendenz hat, werden überwiegend durch Non-Disjunktion verursacht. Die Ursache dieser Störung ist nicht bekannt. Die starke Zunahme solcher numerischen Chromosomenaberrationen mit dem Alter der Mutter lenkt aber den Verdacht auf Stoffe, die chronisch aufgenommen und akkumuliert werden und außerdem die genetische Substanz verändern können. Für Cd trifft alles dieses zu, so daß weitere cytogenetische Untersuchungen und eine epidemiologische Überprüfung auf einen Zusammenhang angebracht wären.

Infolge der normalerweise langsam erfolgenden Kumulation von Cd wird die erforderliche Cd-Konzentration für die Induktion von Chromosomenaberrationen erst nach längerer Zeit erreicht. Die starke Mitosehemmung durch Cd verhindert oder erschwert dann eine Weitergabe der Chromosomendefekte. Eine schnelle Aufnahme von Cd führt dagegen zum Zelluntergang, so daß die Chromosomenschäden ebenfalls nicht an Tochterzellen weitergegeben werden. Diesem Umstand ist es vermutlich zu verdanken, daß Cd weit weniger Schäden anrichtet, als es bei "optimal" wirksamer Dosierung könnte.

5. ZUSAMMENFASSUNG

- 5.1 Fibroblasten des Chinesischen Hamsters wurden 0,5 - 48 h mit CdSO_4 -Konzentrationen von 5×10^{-4} - 10^{-8} Mol/l behandelt. Die Zellfixierung erfolgte entweder unmittelbar nach der Agens-Exposition oder nach Erholungszeiten von 2 - 33 h.
- 5.2 Kurzzeitige hochkonzentrierte CdSO_4 -Exposition verursachte eine Stathmokinase, die einmal mit Hilfe des Mitoseindex und zum anderen durch die Analyse von Mitosefiguren ermittelt wurde.
- 5.3 Durch CdSO_4 -Exposition ergab sich eine konzentrationsabhängige Mitosehemmung, die mit zunehmender Erholungszeit überwunden wurde.
- 5.4 Höhere CdSO_4 -Konzentrationen bewirkten eine Strukturschädigung des Zellkerns, die morphologisch als Kernsegmentierung und folgendem völligem Strukturverlust des Zellkerns erfaßbar ist.
- 5.5 Polyploide Zellen wurden durch Cd weniger stark in ihrer mitotischen Aktivität gehemmt als Zellen mit Chromosomenzahlen im diploiden Bereich. Als Begründung wurde Abhängigkeit der Zellschädigung vom Verhältnis Zellvolumen zu Zelloberfläche diskutiert.
- 5.6 Strukturelle Chromosomenaberrationen konnten nur nach mehr als 13 h Erholung von akuter CdSO_4 -Exposition beobachtet werden. Dann ergab sich gegenüber den Kontrollen eine starke Erhöhung der Aberrationen vom Chromatid-Typ, die nach 21 h Erholung auf die maximale Rate von ca. 20 % der Metaphasen anstieg.
- 5.7 Eine Abhängigkeit der Agens-Wirkung von der quantitativen bzw. qualitativen Zusammensetzung des Mediums und der Zelldichte wurde aufgezeigt.
- 5.8 Die Möglichkeit einer Induktion von strukturellen und numerischen Chromosomenaberrationen menschlicher Keim- und Somazellen durch Cd wurde erörtert.

L I T E R A T U R

1. Bauchinger, M.: Strahleninduzierte Chromosomenaberrationen. Handbuch der Medizinischen Radiologie, II/3, 127 - 180, Berlin Springer 1972,
2. - Untersuchungen über die cytogenetische Wirkung von wasserlöslichen Röntgenkontrastmitteln. Zeitschrift für Zellforschung 63, 506 - 537 (1964),
3. - E. Schmid: Chromosomenanalysen in Zellkulturen des Chinesischen Hamsters nach Applikation von Bleiacetat. Mutation Res., 14 (1972) 95 - 100,
4. - E. Schmid, D. Schmidt: Chromosomenanalyse bei Verkehrspolizisten mit erhöhter Bleilast. Mutation Res., 16 (1972) 407 - 412,
5. Borisy, G. G., E. W. Taylor: The mechanism of action of colchicine binding of colchicine - ^3H to cellular protein. J. Cell. Biol. 34 (1967) 525 - 533,
6. Borisy, G. G., E. W. Taylor: The mechanism of action of colchicine. Colchicine binding to sea urchin eggs and the mitotic apparatus. J. Cell Biol. 34 (1967) 535 - 548,
7. Deknadt, Gh., A. Léonard, B. Ivanov: Chromosome aberrations observed in male workers occupationally exposed to lead. Environ. Physiol. Biochem. (1973), 3, 132 - 138,
8. Ehrhard W.: Die wichtigsten beruflichen Vergiftungen. Lehrbuch der Inneren Medizin III (1970) 762 - 764.
Hrsg. August Sundermann. VEB Gustav Fischer, Jena.
9. Epel, D.: The effects of CO inhibition on ATP level and the rate of mitosis. J. Cell Biol. 17 (1963) 315 - 319,
10. Ferguson, F., Jr.: Colchicine. I. General pharmacology. J. Pharmacol. exp. Ther. 106 (1952) 261 - 270,

11. Fiskesjö, Geirid: The effect of two organic mercury compounds on human leukocytes in vitro. *Hereditas* 64 (1970) 142 - 146,
12. Haddow, A., C. E. Dukes, F. J. C. Roe, B. C. V. Mitchley: The carcinogenicity of cadmium sulphate. *Rep. Brit. Ensp.* 40 (1962) 34 - 35,
13. Ikeuchi et al.: Induction of nuclear envelopes around metaphase chromosomes after fusion with interphase cells. *J. of Cell Biol.* 51 (1971) 104 - 115,
14. Jaffray, I. J. und A. Geneix: Interchromosomal fibers: Human ultrastructural study by a recent technique. *Humangenetik* 25 (1974) 119 - 126,
15. Johnson, M. H.: The effect of cadmium chloride on the blood-testis barrier of the guinea - pig. *J. Reprod. Fert.* 19 (1969) 551 - 553,
16. Kato, Rei: Chromosome breakage induced by a carcinogenic hydrocarbons in Chinese hamster cells and human leucocytes in vitro. *Hereditas* 59 (1968) 120 - 141,
17. Kennedy, G. L., und D. W. Arnold: Absence of mutagenic effects after treatment of mice with lead compounds. *EMS Newsletter* 5 (1971) 37,
18. Kollmorgen, G. M., E. Trucco, G. A. Sacher: Generation cycle analysis of Chinese hamster cells by a new method and its comparison with other methods. *Exp. Cell Res.* 47 (1967) 49 - 62,
19. Lehnert, G., H. Mastall, D. Szadkowski und K.-H. Schaller: Berufliche Bleibelastung durch Autoabgase in Großstadtstraßen. *Deut. Med. Wochschr.* 95 (1970) 1097,
20. Léonard, A., Gh. Deknuds and M. Debackere: Cytogenetic investigations on leucocytes of cattle intoxicated with heavy metals. *Toxicology* 2 (1974) 269 - 273,

21. Levan, A.: Colchicine-induced C-mitosis in two mouse ascites Tumors. *Hereditas* 40 (1954) 1 - 64.
22. Lindegren, C. C., G. Lindegren: Mitochondrial modification and respiratory deficiency in the yeast cell caused by cadmium poisoning. *Mutation Res.* 21 (1973) 315 - 322.
23. Mann, H. B., D. R. Whitney: In: Lienert, G. A. (Hrsg.): Verteilungsfreie Methoden in der Biostatistik. Meisenheim am Glan (1962),
24. Mazia, D.: Fibrillar structure in the mitotic apparatus. Aus: Formation and fate of cell organelles. Symposia of the Internat. Soc. for Cell Biology 6 (1967) 39 - 54
Hrsg.: K. Brehme Warren. New York/London: Acad. Press.,
25. Müller, E.: Aufbau und Funktion zellulärer Membranen. Molekulare Biologie der Zelle, Hrsg. H. Bielka, Fischer-Verlag, Stuttgart (1969).
26. Muro, L. A. und R. A. Goyer: Chromosome damage in experimental lead poisoning. *Arch. Pathol.* 87 (1969) 660,
27. Nilsson, Robert: Some facts about cadmium. *Ambio* 3 No. 2 (1974) 56 - 66,
28. Nobbs, C. L.: Cadmium and the environment - toxicity, economy, control -. Organisation for economic cooperation and Development, Paris 26. 2. 1973.
29. Nordberg, Gunnar: Health hazards of environmental cadmium pollution. *Ambio*, 2, No. 3 (1974) 55.
30. Obe, G. und K. Sperling: Genetische Wirkung von Bleiverbindungen auf menschliche Chromosomen in vivo und in vitro, "Arbeitsgruppe Blei", der Kommission für Umweltgefahren des Bundesgesundheitsamtes Berlin (1970),
31. Oehlkers Friedrich: Chromosome breaks influenced by chemicals. *Heredity Suppl.* 6 (1953) 95 - 105.

32. O'Riordan, M. L., H. J. Evans: Absence of significant chromosome damage in males occupationally exposed to lead.
Nature 247 (1974) 50 - 53,
33. Paton, G. R., A. C. Allison: Chromosome damage in human cell cultures induced by metal salts. Mutation Res., 16 (1972) 332 - 336,
34. Paufler, S. K. R. H. Foote: Effect of triethylenemelamine (TEM) and cadmium chloride on spermatogenesis in rabbits.
J. Reprod. Fert 19 (1969) 309 - 319,
35. Ramel, C.: Genetic effects of mercury compounds, I. Cytological investigations on allium roots. Hereditas 61 (1969) 208 - 230,
36. Ramel, C., J. Magnusson: Genetic effects of organic mercury compounds, II. Chromosome segregation in drosophila melanogaster. Hereditas 61 (1969) 231 - 154,
37. Sakai, H.: Studies on sulfhydryl groups during cell division of sea-urchin eggs. Some properties of mitotic apparatus proteins. Biochem. biophys. Acta (Amst.) 112 (1966) 132 - 145,
38. Sandberg, A. A., T. Aya, T. Ikeuchi, H. Weinfeld: Definition and morphologic features of chromosome pulverization.
A. Hypothesis to explain the phenomenon.
J. Nat. Canc. Inst. 45 (1970) 615 - 623,
39. Schmähl Dietrich: Entstehung, Wachstum und Chemotherapie maligner Tumoren. Aalendorf (1970), Editio Cantor K. G.,
40. Schmid, E., M. Bauchinger, S. Pietruck, G. Hall: Die cytogenetische Wirkung von Blei in menschlichen peripheren Lymphocyten in vitro und in vivo. Mutation Res. 16 (1972) 401 - 406,
41. Schneider, L. K.: RNA synthesis in chromosome connectives.
J. Cell Biol. 56 (1973) 608 - 611,
42. Schwanitz, G., G. Lehnert und E. Gebbart: Chromosomenschäden bei beruflicher Bleibelastung. Deut. Med. Wochsch. 95 (1970) 1636 - 1641.

43. Shelanski, M. L., E. W. Taylor: Isolation of a protein subunit from microtubules. *J. Cell Biol.* 34 (1967) 549 - 554,
44. Shiraishi, Y., H. Kurahashi, T. H. Yosida: Chromosomal aberrations in cultured human leucocytes induced by cadmium sulfide. *Proc. Japan Acad.*, 48 (1972) 133 - 137,
45. Shiraishi, Y.: Cytogenetic studies in 12 patients with Itai-Itai disease. *Humangenetik* 27 (1975) 31 - 44,
46. Skerfving, S., K. Hansson, J. Lindsten: Chromosome breakage in humans exposed to methyl mercury through fish consumption. *Arch. Environ. Health* 21 (1970) 133 - 139,
47. Stenström, T.: Cadmium availability to wheat. *Ambio* 2 No. 3 (1974) 87 - 90.
48. -, M. Vahter: Cadmium and lead in Swedish commercial fertilizers. *Ambio*, 2, No. 3 (1974) 91 - 92,
49. Stubblefield, Elton: DNA synthesis and chromosomal morphology of Chinese hamster cells cultured in media containing N-Deacetyl-N-Methylcolchicine (colcemid). *Cytogenetics of cells in culture*. 223 - 248. Hrsg. R. J. C. Harris. New York, Academic Press (1964),
50. Taylor, J. H.: Asynchronous duplication of chromosomes in cultured cells of Chinese hamster. *J. biophys. biochem. Cytol.* 7 (1960) 455 - 464,
51. Valentin, H., W. Klosterkötter, G. Lehnert, H. Petry, J. Rutenfranz, H. Wittgens: Die gesetzlichen Berufskrankheiten. *Arbeitsmedizin*. Stuttgart, Thieme-Verlag (1971).
52. Vallee, Bert L., David D. Ulmer: Biochemical effects of mercury, cadmium, and lead. *Annual review of Biochemistry*, 41 (1972) 91 - 128,
53. Westermann K., K. H. Näser, K. H. Grahl: *Anorganische Chemie* 587 - 590. Leipzig (1969), VEB.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die die vorliegende Arbeit ermöglicht und mich bei ihrer Durchführung unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. Manfred Bauchinger für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und die wissenschaftliche Beratung.

LEBENS LAUF

Ich, Günter Röhr, wurde am 29. April 1943 in Bokel, Kreis Wiedenbrück, als Sohn des Geflügelzüchters Christian Röhr und seiner Ehefrau Luise geboren.

Nach achtjährigem Volksschulbesuch arbeitete ich im elterlichen Geflügelhof, gleichzeitig besuchte ich drei Jahre eine landwirtschaftliche Berufsschule. Danach arbeitete ich ein Jahr auf einem Geflügelhof in Schwaben und konnte im Anschluß daran in Erding nach einem Vorbereitungskurs die Geflügelzuchtgehilfenprüfung ablegen.

Von 1961 bis 1966 arbeitete ich wieder im elterlichen Geflügelhof. Meinen Wehrdienst leistete ich von April 1966 bis September 1967 ab. Gleichzeitig bereitete ich mich von 1965 an in einem Fernkurs auf die Realschulabschlußprüfung vor, die ich dann im Oktober 1967 in Düsseldorf als Externer ablegte. Anschließend besuchte ich das Westfalen-Kolleg in Bielefeld und erwarb im Januar 1970 die Hochschulreife. Seit dem Sommersemester 1970 studiere ich an der Ludwig Maximilians Universität in München Medizin.

